

## 書誌

- (19) 【発行国】日本国特許庁 (J P)  
 (12) 【公報種別】公表特許公報 (A)  
 (11) 【公表番号】特表平 10-501976  
 (43) 【公表日】平成 10 年 (1998) 2 月 24 日  
 (54) 【発明の名称】ハイブリダイゼーションアッセイを用いて同時に行う真正細菌分類群の検出、単離

## および区別

- (51) 【国際特許分類第 6 版】

C12Q 1/68	ZNA	// C12N 15/09	(C12Q 1/68
C12R 1:46 )		(C12Q 1/68	C12R 1:42 )
(C12Q 1/68		C12R 1:01 )	(C12Q 1/68
C12R 1:44 )		(C12Q 1/68	C12R 1:38 )
(C12Q 1/68		C12R 1:35 )	(C12Q 1/68
C12R 1:32 )			
【F I】			

C12Q 1/68 ZNA A 7823-4B C12N 15/00 A 9282-4B  
 【審査請求】未請求  
 【予備審査請求】有  
 【全頁数】258  
 (21) 【出願番号】特願平 8-502804  
 (86) (22) 【出願日】平成 7 年 (1995) 6 月 23 日  
 (85) 【翻訳文提出日】平成 8 年 (1996) 12 月 24 日  
 (86) 【国際出願番号】PCT/EP95/02452  
 (87) 【国際公開番号】WO96/00298  
 (87) 【国際公開日】平成 8 年 (1996) 1 月 4 日  
 (31) 【優先権主張番号】94870106. 5  
 (32) 【優先日】1994 年 6 月 24 日  
 (33) 【優先権主張国】ベルギー (BE)  
 (31) 【優先権主張番号】95870032. 0  
 (32) 【優先日】1995 年 4 月 7 日  
 (33) 【優先権主張国】ベルギー (BE)  
 (81) 【指定国】EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN

## (71) 【出願人】

【氏名又は名称】インノジェネティクス・エヌ・ブイ  
 【住所又は居所】ベルギー国、ペー 9052 ヘント、インダストリーパーク、ツウィナード 7、ペー・オー・ボックス 4

## (72) 【発明者】

【氏名】ヤネス、ヘルト  
 【住所又は居所】ベルギー国、ペー 3010 ケッセルロー、エー・ファン・ホーレンベケラーン

## 23、ペー・オー・ボックス 1

## (72) 【発明者】

【氏名】ロッサウ、リュディ  
 【住所又は居所】ベルギー国、ペー 2180 エーケレン、ウィルヘフイフェストラート 45

## (72) 【発明者】

【氏名】ファン・ヘーフェルスウィン、ヒューゴ  
 【住所又は居所】ベルギー国、ペー 9270 カルケン、コルマンストラート 80

## (74) 【代理人】

【弁理士】  
 【氏名又は名称】津国 肇 (外 3 名)

## 要約

## (57) 【要約】

本発明は、サンプル中の少なくとも1つの微生物の検出および同定のための、若しくは数個の微生物の同時検出のための方法であって、以下の工程：(i) 必要なら、サンプル中に存在するポリ核酸を放出させ、単離または濃縮する工程；(ii) 必要なら、16S-23S rRNAスペーサー領域若しくはその一部を少なくとも1つの適切なプライマー対を用いて増幅する工程；(iii) 工程(ii)若しくは(ii)のポリ核酸を、表1aに示した少なくとも1つの、好ましくは1以上のスペーサープローブ若しくはその等価物と、適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、および/または図1～103に示した任意のスペーサー配列から誘導された分類群特異的のプローブと、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、ハイブリダイズさせる工程；(iv) 適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、用いられる各々のプローブによって工程(iii)で形成されたハイブリッドを検出する工程；(v) 工程(iv)で得られた特徴的なハイブリダイゼーションシグナルからサンプル中に存在する微生物を同定する工程、を包含する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

1. サンプル中の少なくとも1つの微生物の検出および同定のための、若しくは数個の微生物の同時検出のための方法であって、以下の工程：(i) 必要なら、サンプル中で検出されるべき微生物からポリ核酸を放出させ、単離および/または濃縮する工程；(ii) 必要なら、検出されるべき微生物由来の16S-23S rRNAスペーサー領域若しくはその一部を、少なくとも1つの適切なプライマー対を用いて増幅する工程；(iii) 工程(ii)若しくは(ii)のポリ核酸を少なくとも2つのプローブを含むプローブのセットと、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、ハイブリダイズさせる工程、ここで、該プローブは表1aの配列若しくはその等価物から選択されるか、および/または図1～103に示した任意のスペーサー配列から誘導された分類群特異的のプローブから選択され、該分類群特異的のプローブは、表1aの少なくとも1つのプローブと同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下でハイブリダイズし得るように選択される；(iv) 工程(iii)で形成されたハイブリッドを検出する工程；(v) 工程(iv)で得られた特徴的なハイブリダイゼーションシグナルからサンプル中に存在する微生物を同定する工程、を包含する方法。

2. 前記サンプルが、気道を起源とするものであり、そして工程(iii)で定義されたプローブのセットが以下のスペーサープローブそして、より好ましくは以下のスペーサープローブ：から選択される少なくとも1つのプローブ若しくは該プローブの等価物を含むか、および/または、該プローブのセットは、該サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的のプローブを含み、該スペーサー領域配列はSEQ ID NO 76～106、157～174、124、125、111～115、139～144、若しくは126～130によって示される任意の配列から選択され、そして、該プローブ若しくは等価物は以下の生物：Haemophilus influenzae、Streptococcus pneumoniae、Moraxella catarrhalis、若しくはBordetella pertussisの少なくとも1つを検出する任意のプローブと組み合わせて用いてもよい、請求項1に記載の方法。

3. 前記サンプルが、脳脊髄液から入手したサンプルであり、そして、工程(iii)で記載されたプローブのセットが以下のスペーサープローブそして、より好ましくは以下のスペーサープローブ：から選択される少なくとも1つのプローブ若しくは該プローブの等価物を含むか、および/または、該プローブのセットは、該サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的のプローブを含み、該スペーサー領域配列はSEQ ID NO 116、118～121、若しくは213～215によって示される任意の配列から選択され、そして、該プローブ若

しくは等価物は以下の生物: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*若しくは

*Streptococcus pneumoniae*の少なくとも1つを検出する任意のプロープと組み合わせて用いてもよい、請求項1に記載の方法。

4. 前記サンプルが、尿生殖器管を起源とするものであり、そして、工程(iii)に記載されたプロープのセットが以下のスペーサープロープから選択される少なくとも1つのプロープ若しくは該プロープの等価物を含むか、および/または、該プロープのセットは、該サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プロープを含み、該スペーサー領域配列はSEQ ID NO122、123、197、124若しくは125によって示される任意の配列から選択され、該プロープ若しくは等価物は以下の生物: *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi*若しくは*Streptococcus agalactiae*の少なくとも1つを検出する任意のプロープと組み合わせて用いてもよい、請求項1に記載の方法。

5. 前記サンプルが、食物を起源とするものであり、そして、工程(iii)で定義されたプロープのセットが以下のスペーサープロープそして、より好ましくは以下のスペーサープロープ: から選択される少なくとも1つのプロープ若しくは該プロープの等価物を含むか、および/または、該プロープのセットは、該サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プロープを含み、該スペーサー領域配列はSEQ ID NO116、118~121、213~215、139~144、131、132、154、133~138、195若しくは196によって示される任意の配列から選択され、該プロープ若しくは等価物は、*Campylobacter*種の株を検出する任意のプロープと組み合わせて用いてもよい、請求項1に記載の方法。

6. 前記サンプルが、患者の胃腸管を起源とするものであり、そして、工程(iii)で定義されたプロープのセットが以下のスペーサープロープそして、より好ましくは以下のスペーサープロープ: から選択される少なくとも1つのプロープ若しくは該プロープの等価物を含むか、および/または、該プロープのセットは、該サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プロープを含み、該スペーサー領域配列はSEQ ID NO133~138若しくは195~196によって示される任意の配列から選択され、該プロープ若しくは等価物は、*Campylobacter*種を検出する任意のプロープと組み合わせて用いてもよい、請求項1に記載の方法。

7. サンプル中の1以上の*Mycobacterium*種および亜種を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプロープ: そして、より好ましくは、以下の制限されたグループのスペーサープロープ: の少なくとも1つ若しくは該プロープの等価物と、および/または、SEQ ID NO76~110若しくは157~174から誘導される任意のプロープであって、*Mycobacterium*種と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

8. サンプル中の1以上の*Mycobacterium tuberculosis*複合体株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプロープ: の少なくとも1つ若しくは該プロープの等価物と、および/または、SEQ ID NO76から誘導される任意のプロープであって、*M. tuberculosis*複合体株と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。

9. MAIS複合体由来の1以上の*Mycobacterium*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプロープ: の少なくとも1つ若しくは該プロープの等価物と、および/または、SEQ ID NO77~100若しくは108~110から誘導される任意のプロープであって、MAIS複合体由来の株と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。

10. サンプル中の1以上の*M. avium*および*M. paratuberculosis*株を検出しそして同定する方法であっ

て、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 77 および 78 から誘導される任意のプローブであって、*M. avium* 若しくは *M. paratuberculosis* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 9 に記載の方法。

11. サンプル中の1以上の *Mycobacterium intracellulare* 株および *M. I. C* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、若しくは 99 から誘導される任意のプローブであって、*M. intracellulare* 株および *M. I. C* 株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 9 に記載の方法。

12. サンプル中の1以上の *Mycobacterium intracellulare* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 89 から誘導される任意のプローブであって、*M. intracellulare* 株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 9 に記載の方法。

13. サンプル中の1以上の *Mycobacterium scrofulaceum* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 100 から誘導される任意のプローブであって、*M. scrofulaceum* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 9 に記載の方法。

14. サンプル中の1以上の *Mycobacterium kansasii* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：そして、より好ましくは：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 101、167、168 若しくは 169 から誘導される任意のプローブであって、*M. kansasii* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。

15. サンプル中の1以上の *Mycobacterium chelonae* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 102、103、若しくは 174 から誘導される任意のプローブであって、*M. chelonae* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。

16. サンプル中の1以上の *Mycobacterium gordonae* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：そして、より好ましくは：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 104、105 若しくは 106 から誘導される任意のプローブであって、*M. gordonae* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。

17. サンプル中の1以上の *Mycobacterium ulcerans* 株若しくは *M. marinum* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 157 から誘導される任意のプローブであって、*M. ulcerans* 若しくは *M. marinum* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。

18. サンプル中の1以上の *Mycobacterium genavense* 株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程 (iii) が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 158、159、160、161 若しくは 162 から誘導される任意のプローブであって、*M. genavense* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。

19. サンプル中の1以上の*Mycobacterium xenopi*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO163から誘導される任意のプローブであって、*M. xenopi*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
20. サンプル中の1以上の*Mycobacterium simiae*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO164若しくは165から誘導される任意のプローブであって、*M. simiae*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
21. サンプル中の1以上の*Mycobacterium fortuitum*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO166から誘導される任意のプローブであって、*M. fortuitum*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
22. サンプル中の1以上の*Mycobacterium celatum*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO170から誘導される任意のプローブであって、*M. celatum*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
23. サンプル中の1以上の*Mycobacterium haemophilum*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO171、172若しくは173から誘導される任意のプローブであって、*M. haemophilum*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
24. サンプル中の1以上の*Mycobacterium*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項7に記載の方法。
25. サンプル中の1以上の*Mycoplasma*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO124若しくは125から誘導される任意のプローブであって、*Mycoplasma*種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
26. サンプル中の1以上の*Mycoplasma pneumoniae*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO125から誘導される任意のプローブであって、*Mycoplasma pneumoniae*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項25に記載の方法。
27. サンプル中の1以上の*Mycoplasma genitalium*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、または、SEQ ID NO124から誘導される任意のプローブであって、*Mycoplasma genitalium*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項25に記載の方法。
28. サンプル中の1以上の*Pseudomonas*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO111、112、113、114若しくは115から誘導される任意のプローブであって、*Pseudomonas*株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
29. サンプル中の1以上の*Pseudomonas aeruginosa*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは

- 該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 11 から誘導される任意のプローブであって、*Pseudomonas aeruginosa*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項28に記載の方法。
30. サンプル中の1以上の*Staphylococcus*種を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 39、140、141、142、143若しくは144から誘導される任意のプローブであって、*Staphylococcus*種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
31. 1以上の*Staphylococcus aureus*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ、および好ましくは両方、若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 39、140、141、142若しくは143から誘導される任意のプローブであって、*Staphylococcus aureus*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項30に記載の方法。
32. サンプル中の1以上の*Staphylococcus epidermidis*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)がSEQ ID NO1 44から誘導される任意のプローブであって、*Staphylococcus epidermidis*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項30に記載の方法。
33. サンプル中の1以上の*Acinetobacter*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 26、127、128、129若しくは130から誘導される任意のプローブであって、*Acinetobacter* sp.と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
34. サンプル中の1以上の*Acinetobacter baumannii*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 26から誘導される任意のプローブであって、*Acinetobacter baumannii*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項33に記載の方法。
35. サンプル中の1以上の*Listeria*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 16、118、119、120、121、213、214若しくは215から誘導される任意のプローブであって、*Listeria*種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
36. サンプル中の1以上の*Listeria monocytogenes*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：そして、より好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 18若しくは120から誘導される任意のプローブであって、*Listeria monocytogenes*と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項35に記載の方法。
37. サンプル中の1以上の*Brucella*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO1 31、132若しくは154から誘導される任意のプローブであって、*Brucella*株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。
38. サンプル中の1以上の*Salmonella*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)

が以下のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7若しくは1 3 8から誘導される任意のプローブであって、Salmonella株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

3 9. サンプル中の1以上のChlamydia株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 1 2 2、1 2 3若しくは1 9 7から誘導される任意のプローブであって、Chlamydia株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

4 0. サンプル中の1以上のChlamydia trachomatis株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 1 2 3若しくは1 9 7から誘導される任意のプローブであって、Chlamydia trachomatisと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項3 9に記載の方法。

4 1. サンプル中の1以上のChlamydia psittaci株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(iii)が少なくとも以下のプローブ：若しくは該プローブの等価物と、および／または、SEQ ID NO 1 2 2から誘導される任意のプローブであって、Chlamydia psittaciと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項3 9に記載の方法。

4 2. サンプル中の1以上のStreptococcus株を検出する方法であって、ここで、工程(iii)がSEQ ID NO 1 4 5、1 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2若しくは1 5 3から誘導される任意のプローブであって、Streptococcus株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

4 3. サンプル中のChlamydia trachomatisを特異的に検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、1 6 S-2 3 S rRNAスペーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、該等価物がChlamydia trachomatisのスペーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、該等価物は1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーと配列が異なっている、請求項1に記載の方法。

4 4. サンプル中のListeria種を特異的に検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、1 6 S-2 3 S rRNAスペーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、該等価物がListeria種のスペーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、該等価物は1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーと配列が異なっている、請求項1に記載の方法。

4 5. サンプル中のMycobacterium種を特異的に検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、1 6 S-2 3 S rRNAスペーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、該等価物がMycobacterium種のスペーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、該等価物は1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーと配列が異なっている、請求項1に記載の方法。

4 6. 請求項1～4 5および5 1～5 3に定義したプローブ若しくはプライマーの少なくとも1つを含む組成物。

4 7. 請求項1～4 2および5 1のいずれか1項で定義したプローブ。

4 8. 請求項4 3～4 5および5 2～5 3のいずれか1項で定義するプライマー。

4 9. 固体支持体、より好ましくはメンブランスストリップ上の既知の位置に固定されている、請求項1

～4 2および5 1に定義した任意のプローブを包含するリバースハイブリダイゼーション法。

5 0. サンプル中の、少なくとも1つの微生物を検出しそして同定するための、若しくは数個の微生物

を同時に検出しそして同定するための、キットであって、以下の成分：(i) 適切な場合、16S-23S rRNA スペーサー領域若しくはその一部の増幅を可能にする少なくとも1つの適切なプライマー対；

(ii) 請求項1〜42および51で定義したプローブのうち少なくとも1つ；

(iii) 該プローブと該サンプル中に存在するポリ核酸あるいはそれらの増幅産物とのハイブリダイゼーション反応を可能にする緩衝液、若しくは該緩衝液を作成するのに必要な成分；

(iv) 適切な洗浄条件下で、形成された該ハイブリッドの洗浄を可能にする溶液、若しくはその溶液を作成するのに必要な成分；

(v) 適切な場合、先行のハイブリダイゼーションの結果得られた該ハイブリッドを検出する手段、を含むキット。

51. サンプル中の1以上の*Yersinia enterocolitica*株を検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)が以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは該プローブの等価物と、および/または、SEQ ID NO195若しくは196から誘導される任意のプローブであって、*Yersinia enterocolitica*株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

52. サンプル中の*Brucella*種を特異的に検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16S-23S rRNA スペーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、該等価物が*Brucella*種のスペーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、該等価物は1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーと配列が異なっている、請求項1に記載の方法。

53. サンプル中の*Yersinia enterocolitica*種を特異的に検出しそして同定する方法であって、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16S-23S rRNA スペーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、該等価物が*Yersinia enterocolitica*種のスペーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、該等価物は1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーと配列が異なっている、請求項1に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

ハイブリダイゼーションアッセイを用いて同時に行う真正細菌分類群の検出、単離および区別 本発明は、ハイブリダイゼーション手法による生物学的サンプル中の真正細菌生物の特異的な検出に用いるための、16Sリボソームリボ核酸(rRNA)遺伝子と23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域由来の核酸プローブ、ならびに生物学的サンプル中の真正細菌生物の上記領域の増幅に用いるための核酸プライマーに関する。本発明はまた新規なスペーサー領域配列に関し、これらの配列から上記プローブ若しくはプライマーが誘導され得る。ポリメラーゼ連鎖反応およびいくつかの他の核酸増幅技術の出現により、全ての種類の生物学的サンプル中の微生物の分析におけるDNAプローブ技術の影響は増大しつつある。もしも妥当な増幅および/または検出システムが用いられる場合に、より特異的でありそして潜在的により感度が高ければ、このDNAプローブアプローチは最終的には従来の単離技術に取って代わるかもしれない。核酸に基づくテストの信頼性は、用いられるプローブおよび/またはプライマーの感度と特異性とに実質的に依存する。したがって、このタイプのアッセイの第一歩は、目的の生物群に対して独特な核酸配列を同定することである。

文献に記載された、および/または市販の核酸に基づくテストの大部分は、生物学的サンプル中のただ1つの特定の生物の検出を目的としている。通常、ほとんどの生物学的サンプルは、非常に多くの種類の臨床的に関連した微生物を含み得るので、存在する可能性のある全ての関連した生物を検出するためには数多くの別々のアッセイが行われなければならない。このアプローチは、非常に経費が高く、困難



であり、時間がかかる。その結果、ほとんどの基礎分析研究室において、特定のサンプルについて実際に行われるテストの数は、最も関連のある数種の生物の検出に制限される。したがって、多数の異なる生物を迅速、容易、かつ同時に検出することを可能にするシステムを利用することは非常に便利である。同じアッセイにおいてスクリーニングされる生物が多いほど、この手順は対費用効果がよりよい。初期に刊行された論文で提唱されたように、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子との間に位置するスペーサー領域はまた、内部転写スペーサー(internal transcribed spacer: ITS)ともいわれ、細菌起源の病原体の検出のためのプローブの開発にとって有利な標的領域である(国際出願第WO 91/16454号; Rossau et al., 1992; EPA-0395292)。それらの最もよく理解されている利点の一つは、多くの種類の細菌分類群に独特な配列が、細菌ゲノムの非常に限られた領域に見いだされ得るということである。この特徴により、特定のタイプの生物学的サンプル中に存在する可能性のある一連の生物の同時検出を可能にする「プローブパネル」の有利な設計が可能になる。さらに、ある程度普遍的に保存された核酸配列、より特定するとそれぞれ16S rRNA遺伝子の3'部分および23S rRNA遺伝子の5'部分に位置する配列、によって近接されているので、ほとんど全てのスペーサーは限られた増幅プライマーセットによって同時に増幅され得る。あるいは、特定のプライマーセットはスペーサー配列自身から誘導され、それにより種特異的若しくは群特異的増幅が可能になる。

16S-23S rRNAスペーサー領域は、ほとんど全ての真正細菌生物のゲノム内に1つまたは複数のコピーで存在する比較的短い(約200~1000塩基対)DNA伸張部である。もしも1つの細菌のゲノムに複数のコピーが存在する場合、これらのコピーは、同一であるか(いくつかのNeisseria種で最もよく起きる)または相互に異なるか(E. coliの場合)のいずれかであり得る。この違いは、いくつかのヌクレオチドに限られ得るが、無視できない長さの欠失および挿入も存在し得る。

現在まで、スペーサープローブは限られた数の生物について記載され、公的に利用できるようになっており、それらの多くは国際出願第WO 91/16454号に開示されている。上記のように、病原体のパネルを同時に検出することが可能であることは非常に利点があることである: 例えば、同じタイプの生物学的サンプル中に存在する可能性のある病原体のパネル若しくは同じタイプの疾患の兆候を引き起こす可能性のある病原体のパネル(これらは、臨床的および/または生化学的に区別することが困難である)、あるいは同じ分類群に属する生物のパネルである。異なるパネルをできるだけ完全に作成するため、スペーサー領域内に位置し、そして少なくとも以下の細菌群若しくは種の同定を可能にするさらなるプローブ若しくはプローブのセットが必要とされている: - Mycobacterium 種 -

Listeria 種 - Chlamydia 種 - Acinetobacter 種 - Mycoplasma 種 - Straptococcus 種 -

Staphylococcus 種 - Salmonella 種 - Brucella 種 - Yersinia 種 - Pseudomonas 種 これらのさら

なるスペーサープローブは、それらが、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、少なくとも1つの他のプローブと一緒に同時に用いられ、特定の生物のパネルの検出を可能にするように細部まで

正確に設計されることが必要である。

したがって、本発明の目的は、プローブ若しくはプローブのセットを選択することである。これらは16S-23S rRNAスペーサー領域を標的として有し、そして少なくとも1つ、好ましくは1つ以上の上記の微生物の検出および同定を可能にする。このプローブ若しくはプローブセットは、それらが、少なくとも1つの他のプローブ、好ましくはやはり16S-23S rRNAスペーサー領域を起源とするプローブと、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で組み合わせられて、サンプル中のいくつかの微生物の同時検出をおそらく可能にするように選択される。

上記のスペーサープローブ若しくはプローブセットの選択において用いられる選択方法を提供すること

もまた、本発明の目的である。

サンプル中の少なくとも1つの微生物の検出および同定のための、若しくはサンプル中のいくつかの微生物の同時検出および同定のための、迅速かつ信頼性のあるハイブリダイゼーション方法を提供すること

ともまた、本発明の目的である。

特定のタイプのサンプル中存在しそうな一連の微生物を、同時に検出し同定することを可能にするハイブリダイゼーション方法を提供することは、本発明のより特定の目的である。

気道由来のサンプル中の微生物の同時検出が可能なプローブ若しくはプローブのセットを提供すること

は、本発明のより特定の目的である。

脳脊髄液由来のサンプル中の微生物の同時検出が可能なプローブ若しくはプローブのセットを提供すること

ことは、本発明のもう一つのより特定の目的である。

尿生殖器官由来のサンプル中の微生物の同時検出が可能なプローブ若しくはプローブのセットを提供すること

ことは、本発明のさらに別のより特定の目的である。

患者の胃腸管から採取したサンプル中の微生物の同時検出が可能なプローブ若しくはプローブのセット

を提供することは、本発明のさらに別のより特定の目的である。

食物起源のサンプル若しくは環境サンプル中の微生物の同時検出が可能なプローブ若しくはプローブの

セットを提供することは、本発明のさらに別のより特定の目的である。

サンプル中の特定の分類群、若しくは特定の一連の分類群を検出し同定する方法を提供することは、本発明のさらなる目的である。

この分類群は完全な属か、属の中の亜群か、種か、さらに種の中のサブタイプ (亜種、血清型 (serovars)、シーケバール (sequevars)、生理学的性状型 (biovars) …) のいずれかである。

*Mycobacterium* 種および亜種、より特定すると、*M. tuberculosis* 複合株、MAIS 複合体由来の

*Mycobacterium* 株、*M. avium* および *M. paratuberculosis*、*M. intracellulare* および *M. intracellulare* 様株、*M. scrofulaceum*、*M. kansasii*、*M. chelonae*、*M. gordonae*、*M. ulcerans*、*M. genavense*、

*M. xenopi*、*M. simiae*、*M. fortuitum*、*M. malmoense*、*M. celatum*、および *M. haemophilum* の検出用プロ

ーブ若しくはプローブセットを提供することは本発明のさらに特定の目的である。

*Mycoplasma* 株、より特定すると *M. pneumoniae* および *M. genitalium* の検出用プローブ若しくはプローブセ

ットを提供することもまた本発明の目的である。

*Pseudomonas* 株、より特定すると *P. aeruginosa* の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供すること

ともまた本発明の目的である。

*Staphylococcus* 種、より特定すると *S. aureus* および *S. epidermidis* の検出用プローブ若しくはプローブ

セットを提供することもまた本発明の目的である。

*Acinetobacter* 株、より特定すると *A. baumannii* の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供すること

ともまた本発明の目的である。

*Listeria* 株、より特定すると *Listeria monocytogenes* の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供

することもまた本発明の目的である。

*Brucella* 株の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供することもまた本発明の目的である。

*Salmonella* 株の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供することもまた本発明の目的である。

*Chlamydia* 株、より特定すると *C. trachomatis* および *C. psittaci* の検出用プローブ若しくはプローブセッ

トを提供することもまた本発明の目的である。

*Streptococcus* 株の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供することもまた本発明の目的である

*Yersinia enterocolitica* 株の検出用プローブ若しくはプローブセットを提供することもまた本発明の目的である。

特定の生物の 16S-23S rRNA スペーサー領域の特異的な増幅を可能にするプライマーを提供

することも本発明の目的である。より特定すると、*Mycobacterium*、*Chlamydia*、*Listeria*、*Brucella* および *Yersinia enterocolitica* 株のスペーサー領域の特異的な増幅のためのプライマーを提供することが本発明の目的である。

16S-23S rRNA スペーサー領域の新規な配列（この配列から有用なスペーサープローブ若しくはプライマーを誘導し得る）を提供することも本発明の目的である。  
 上記のプローブおよび／またはプライマーが用いられる、サンプル中の少なくとも1つの生物を検出するためのキットを提供することも本発明の目的である。  
 いくつかの上記の生物のスペーサー配列についてはすでに文献若しくは公的に利用可能なデータバンクで公開されていることに注意されたい。  
 しかし、本発明で開示されたスペーサー領域配列（図1～103）は新規であり、それらが、先行文献ですでにスペーサー配列が記載された種と同じ種を起源とする場合には、それらはすでに記載された配列とはある程度異なっていることが明確にされるべきである。  
 さらに、特定の生物のパネル、すなわち共通の分類群に属する生物、若しくは同じタイプのサンプルに存在する可能性のある生物のパネル、の検出および同定を可能にする特異的プローブおよびプローブセットを、スペーサー領域に関する配列データの蓄積から選択することが本発明の第1の目的である。  
 この選択手順は、通常理論的な部分と実験的な部分とからなる。第1に、異なるスペーサー配列は、「最も近縁のもの (closest neighbour)」のスペーサー配列と、あるいは同じサンプルに存在しそうなほかの微生物のスペーサー配列と整合性がある必要がある。このことにはもちろん実施例に記載したようにスペーサー配列の配列決定が必要である。この整合性から多様な領域が定義され、そこから所望のハイブリダイゼーション特性を有するプローブが、当業者に公知のガイドラインに沿って設計され、以下のように、より詳細に特定される。  
 第2に、設計されたプローブは実験的にテストされ、それらの有用性について、特定のハイブリダイゼーション条件下でおよび／または他のプローブと組み合わせて、評価される必要がある。実験的テストは当業者に公知の任意のハイブリダイゼーション法にしたがって行うことができるが、同一条件下で異なるプローブを同時にテストするための好ましいアッセイは、リバースハイブリダイゼーションアッセイである。本発明において同時に用いられる異なるプローブのリバースハイブリダイゼーションの特別な形式は、以下に記載するようなLiPA（ラインプローブアッセイ）である。  
 実験的テストの際に、プローブが標的核酸にハイブリダイズするとき予期し得ないハイブリダイゼーションの挙動が示される場合があるが、そのときは特定のプローブの適合が必要とされるかもしれない。さらに、プローブの特異性および感度が、検出されるべき分類群に属する株も別の分類群に属する株もどちらも大きなコレクションで試験される必要がある。  
 スペーサー領域のゲノムの不均一性により、あるいは同じ生物内で異なる配列を有する多数のスペーサー配列の存在により、よりよい感度および／または特異性を得るために、別の株のスペーサー領域の配列決定をするか、あるいは同じ株の別のスペーサー領域の配列決定をして新しい配列のデータによってプローブを再設計することが必要であることがよくある（例えば、実施例3参照）。いくつかの場合には、同じ生物についていくつかのプローブを用いることが必要であるか若しくは望ましいかもしれない（実施例2および7参照）。また、スペーサー領域の配列決定では、いくつかの生物は予期しない関連性（非関連性）を示すこともあり、それらは古典的な分類学的基準に反した株の分類の修正につながり得る（実施例2および7）。  
 結局、プローブ選択手順の実験的部分は不可欠であり、理論的な部分と相補的なものである。プローブ設計は、特にリバースハイブリダイゼーションの固定された条件（各プローブについて同じ条件）下では、簡単ではなく、プローブはそれらがリバースハイブリダイゼーション形式において用いられ得る前に細部まで正確に評価されなければならない。したがって、プローブは公知の遺伝子配列から理論的な基礎に基づいて必ずしも簡単に誘導され得るわけではない。  
 所望の特性を有するプローブを設計するには以下の有用なガイドラインにしたがってもよい。  
 本明細書中に記載されるようなハイブリダイゼーション反応の範囲と特異性は多くの因子に影響されるので、これらの1以上の因子の操作が特定のプローブの正確な感度と特異性、すなわち、それがその標

的と完全に相補的であるか否か、を決定する。本明細書中でさらに説明される種々のアッセイ条件の重要性と効果は、当業者には公知である。

第1に、【プローブ：標的】核酸ハイブリッドの安定性は、アッセイ条件と適合するように選択されるべきである。これは、長いA Tリッチな配列を除くことによって、ハイブリッドをG : C塩基対で終結させることによって、および適切なT<sub>m</sub>を有するプローブを設計することによって達成することができる。プローブの始点と終点は、長さおよびGC%によって、最終アッセイが行われる温度より約2～10℃高いT<sub>m</sub>となるように選択されるべきである。プローブの塩基組成は、A T塩基対に比べて、G C塩基対の方がさらなる水素結合により、より一層の熱安定性を示すので、重要である。したがって、G C含量の高い相補的核酸を含むハイブリダイゼーションは高温でも安定であろう。プローブが用いられる条件（例えばイオン強度およびインキュベーション温度のような）もまたプローブの構築において考慮されるべきである。ハイブリダイゼーションが、反応混合物のイオン強度が増加するにつれて増加すること、およびハイブリッドの熱安定性がイオン強度の増加につれて増加することは公知である。一方、ホルムアミド、尿素、DMSOおよびアルコールのような化学的試薬は水素結合を破壊し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増大させる。そのような試薬による水素結合の不安定化はT<sub>m</sub>を非常に低下させることができる。一般に、長さが約10～50塩基の合成オリゴヌクレオチドプローブにとって最適なハイブリダイゼーションは、与えられた二本鎖の融解温度より約5℃低い温度で起きる。最適温度より低い温度でのインキュベーションはミスマッチ塩基配列のハイブリダイズを可能にし、したがって特異性が低下する結果となり得る。

ストリンジェンシーの高い条件下でのみハイブリダイズするプローブがあるのが望ましい。高いストリンジェンシー条件下では、相補性の高い核酸ハイブリッドのみが形成される。十分な程度の相補性がないハイブリッドは形成されない。したがって、アッセイ条件のストリンジェンシーは、ハイブリッドを形成する二本の核酸鎖の間に必要とされる相補性の大きさを決定する。ストリンジェンシーは、標的核酸と形成されたハイブリッドと非標的核酸と形成されたハイブリッドとの間の安定性の差を最大化するように選択される。本発明のいくつかの実施例では、例えば、高度に関連した生物を分別する必要がある場合には、ただ1つの塩基対変化を検出する必要もあり得る。そのような場合には、非常に高いストリンジェンシーの条件が必要とされる。

第2に、プローブは【プローブ：非標的】核酸ハイブリッドの安定性を最小化するように配置されるべきである。これは、非標的生物に対して完全に相補的な長さを最小化することにより、非標的配列に対して相同なG Cリッチな領域を除くことにより、そしてできるだけ多くの不安定化ミスマッチが広がるようにプローブを配置することにより達成することができる。プローブ配列が特定のタイプの生物のみを検出するのに有用であるかどうかは、【プローブ：標的】ハイブリッドと【プローブ：非標的】ハイブリッドとの間の熱安定性の違いに大きく依存する。プローブの設計においては、これらのT<sub>m</sub>値の差はできるだけ大きくあるべきである（例えば、少なくとも2℃、好ましくは5℃）。標的核酸配列の長さ、および、したがってプローブ配列の長さもまた重要であり得る。ある場合には、特定の領域からの位置も長さも多様ないくつかの配列があり、これらは所望のハイブリダイゼーション特性を有するプローブを生じる。

別の場合には、ある配列は、塩基がただ一つ異なる別の配列より著しく良好であり得る。完全には相補的でない核酸をハイブリダイズさせることは可能であるが、通常、完全に相補的な塩基配列の最も長い伸張部がハイブリッドの安定性を主に決定する。異なる長さおよび塩基組成のオリゴヌクレオチドプローブを用い得るが、本発明で好ましいオリゴヌクレオチドプローブは長さが約10～50塩基であり、標的

核酸に対して十分に相溶性があるものである。

第3に、ハイブリダイゼーションに対して阻害的な強固な内部構造を形成することが知られている標的DNA若しくはRNA内の領域は好ましくない。同様に、広範な自己相補性を有するプローブも除かれるべきである。上述のように、ハイブリダイゼーションは、水素結合した二本鎖を形成する2つの相補的な一本鎖核酸の会合である。この2本の鎖のうち一方が全体的に若しくは部分的にハイブリッドに含まれるなら、それは新しいハイブリッドの形成に参与することはできないということを暗に示している。

十分な自己相補性がある場合には、1つのタイプのプローブ分子内で形成される分子内および分子間ハイブリッドもあり得る。そのような構造は細心のプローブ設計により排除され得る。目的の配列の実質的な部分が一本鎖となるようにプローブを設計することにより、ハイブリダイゼーションの効率および範囲は大いに増大し得る。このタイプの相互作用を探索するためにコンピュータープログラムを利用することができる。しかし、特定の例では、このタイプの相互作用を排除することは必ずしも可能ではない。

本発明のプローブは、同時ハイブリダイゼーションにセットで用いられ得るように、同じハイブリダイゼーション条件下で最適なパフォーマンスを達成するように設計される。このことは、これらのプローブの有用性を高度に増大させ、結果として時間と労働を著しく節約する。明らかに他のハイブリダイゼーション条件が好ましい場合には、それに応じて全てのプローブを、その末端でいくつかのヌクレオチドを付加するか若しくは欠失させることにより適合させるべきである。このような付随した適合化は実質的に同じ結果を生じる、すなわち、個々のプローブは決められた標的とそれでもなお特異的にハイブリダイズするということが理解されるべきである。NASBAシステムの場合のように、増幅された材料が天然のRNAであってDNAでない場合には、そのような適合化もまた必要であり得る。ハイブリダイゼーション条件は、培地中の成分の性質および濃度、ならびにハイブリッドが形成され洗浄される温度のような、いくつかのパラメーターに応じてモニターすることができる。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄温度は、プローブの配列（その核酸組成、種類、および長さ）に応じた上限値に制限される。本発明において記載されるプローブのハイブリダイゼーションおよび洗浄の最高温度は、実施例の項で記載される特定のハイブリダイゼーションおよび洗浄培地においては、40℃～60℃、より好ましくは45℃～55℃の範囲である。より高い温度では、二本鎖形成（＝ハイブリッドの形成）は、プローブと標的との間に形成されたハイブリッドの解離（若しくは変性）と競合する。

本発明の好ましいハイブリダイゼーション培地は、3×SSCおよび20%ホルムアミドを含有し、ハイブリダイゼーション温度は45℃～55℃の範囲であり得、好ましいハイブリダイゼーション温度は50℃である。好ましい洗浄培地は3×SSCおよび20%ホルムアミドを含有し、好ましい洗浄温度は好ましいハイブリダイゼーション温度と同じ、すなわち、好ましくは45℃～55℃、最も好ましくは50℃である。

しかし、改変が誘導される場合、それがプローブにおいてでも培地においてでも、必要な特異性を得るためにプローブが用いられ得る温度は、以下の参考文献に記載されたような、既知の關係にしたがって変化させるべきである： Hames B and Higgins S (eds.). Nucleic acid hybridization A practical

approach, IRL Press, Oxford, U.K., 1985.

16S-23S rRNAスパーサー領域から誘導され、そして本発明により記載された選択された核酸プローブを表1aに列挙する (SEQ ID NO (配列番号) 1～64、175～191、193～201および210～212)。実施例の項で記載するように、いくつかのこれらのプローブは他に比べて良好

な感度および／または特異性を示し、それゆえ、その良好なプローブを生物学的サンプル中の目的の生物を検出する方法において選択的に使用する。しかし、特定の適用（例えば、疫学、亜株タイプ分け）に対しては特異性がより少ないかおよび／または感度がより低いプローブを含むプローブセットが非常に有益であるということもあり得る（実施例7参照）。

以下の定義は、本発明の下記に詳述する異なる実施態様において用いられる用語および表現を説明するのに役立つ。

用語「スパーサー」は、16S-23S rRNA内部転写スパーサー領域を指す略語である。

用語「プローブ」は、検出されるべき標的配列とハイブリダイズするのに十分に相補的である配列を有する一本鎖配列特異的オリゴヌクレオチドをいう。

より特別な用語「スパーサープローブ」は、上記で定義したように、検出されるべき生物（若しくは生物群）のスパーサー領域に位置する標的配列とハイブリダイズするのに十分に相補的である配列を有するプローブをいう。

好ましくは、上記プローブは検出されるべき標的配列の完全な相補物と70%、80%、90%若しくは95%以上相同である。これらの標的配列はゲノムDNA若しくは前駆体RNA、またはそれらの増幅されたもののいずれかである。

好ましくは、これらのプローブは、約5～50ヌクレオチドの長さであり、より好ましくは約10～25ヌクレオチドの長さである。本発明に用いられるヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、およびイノシンのような改変ヌクレオチド、そのハイブリダイゼーション特性を実質的に変えない改変された基を有するヌクレオチドであってもよい。さらに、以下に特定する任意のプローブは、そのまま、若しくはそれらの相補型で、あるいはそれらのRNA型（その場合TはUで置き換わる）で用いられ得るということは当業者には明らかである。

本発明のプローブは、対応するヌクレオチド配列を含む挿入物を有する組換えプラスミドをクローニングすることにより形成され得る。もし必要なら、この対応するヌクレオチド配列をクローン化されたプラスミドから適切なヌクレアーゼを用いて切り出し、それらを、例えば、分子量によって分画することにより、回収する。本発明のプローブはまた化学的に、例えば、従来のホスホトリエステル法により、

合成することもできる。

本明細書中で用いられる用語「相補的」核酸は、その核酸配列がお互いに完全に塩基対形成した二重らせんを形成することを意味する。

本出願で用いられる用語「相同な」は、同一と同義である：これは、例えば、80%相同であるといわれるポリ核酸は、配列を並べたとき同じ位置で80%同一の塩基対を示すということの意味する。

用語「ポリ核酸」は、少なくとも10、20、30、40、若しくは50個の隣接したヌクレオチドを含む二本鎖若しくは一本鎖のcDNA若しくはゲノムDNAまたはRNAに対応する。長さが100ヌクレオチドより少ないポリ核酸はしばしばオリゴヌクレオチドともいわれる。一本鎖ポリ核酸配列は、

本発明においては常に5'末端から3'末端で示される。

用語「最も近縁のもの」は、DNAホモロジーから見て最も近接して関連していることが知られているか若しくは期待され、目的の生物から区別されなければならない分類群を意味する。

「所望のハイブリダイゼーション特性」という表現は、プローブがそのために設計された生物由来のDNA若しくはRNAとのみハイブリダイズし、他の生物由来のDNA若しくはRNA（同じサンプル中に存在しがちな最も近縁のもの若しくは生物）とはハイブリダイズしないことを意味する。実際には、これは、ハイブリダイゼーションシグナルの強さが、そのためにプローブが設計された生物由来の標的DNA若しくはRNAを非標的配列と比べると、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍若しくはそれ以上であることを意味する。

これらの所望のハイブリダイゼーション特性は、後に本テキストでいわゆる「特異的ハイブリダイゼーション」といわれるものに相当する。

「分類群特異的ハイブリダイゼーション」若しくは「分類群特異的プローブ」

という表現は、そのプローブが、そのためにそれが設計された分類群由来のDNA若しくはRNAとのみハイブリダイズし、他の分類群由来のDNA若しくはRNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

用語「分類群」は、完全な属若しくは属内の亜群、種若しくはさらに種内のサブタイプ（亜種、血清型、シーケバール (sequevars)、生理学的性状型…) を指すことができる。

用語「特異的増幅」若しくは「特異的プライマー」は、そのプライマーが、そのためにそれが設計された生物からのスペーサー領域のみを増幅し、他の生物からのそれは増幅しないという事実をいう。

用語「感度」は偽陰性の数をいう：すなわち、検出されるべき100株のうち1株を数え損なった場合、そのテストは  $(100 - 1 / 100) \% = 99\%$  の感度を示す。

用語「特異性」は、偽陽性の数をいう：すなわち、検出した100株のうち2株が、そのためにテストが設定されなかった生物に属すると考えられる場合、そのテストの特異性は  $(100 - 2 / 100) \% = 98\%$  である。

「好ましい」として選択されたプローブは80%以上、好ましくは90%以上、そして最も好ましくは95%以上の感度および特異性を示す。

用語「プライマー」は、コピーされる核酸鎖に相補的なプライマー伸張産物の合成を開始するポイントとして作用し得る一本鎖DNAオリゴヌクレオチド配列をいう。プライマーの長さおよび配列は、それらが伸張産物の合成を開始することを可能にするようなものでなければならない。好ましくはこのプライマーは約5～50ヌクレオチドの長さである。特定の長さおよび配列は、必要とされるDNA若しくはRNA標的の複雑さ、ならびに温度およびイオン強度のようなプライマーを使用する条件に依存する。増幅プライマーは、適切な増幅を保証する対応する鋳型配列に完全にマッチする必要はないという事

実は、文献に詳細に記載されている (Kwok et al., 1990)。

用いられる増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR : Saiki et al., 1988)、リガーゼ連鎖反応 (LCR ; Landgren et al., 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991)、核酸配列に基づく増幅 (NASBA ; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991)、転写に基づく増幅システム (TAS ; Kwok et al., 1989)、鎖置換増幅 (SDA ; Duck, 1990; Walker et al., 1992) 若しくはQ $\beta$ レプリカーゼによる増幅 (Lizardi et al., 1988; Lomeli et al., 1989) 若しくは当業者に公知の核酸分子を増幅する任意の適切な方法のいずれかであり得る。

プライマー若しくはプローブとして用いられるオリゴヌクレオチドはまたヌクレオチドアナログ、例えば、ホスホロチオエート (Matsukura et al., 1987)、アルキルホスホロチオエート (Miller et al., 1979) 若しくはペプチド核酸 (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 1993) を含んでもよく、あるいは挿入物質 (Asseline et al., 1984) を含んでもよい。

本発明の元のDNA配列に導入される他の変更若しくは改変のほとんどについては、これらの変更は、その下でオリゴヌクレオチドを用いて必要な特異性および感度を得る条件に関して、適合化を必要とする。しかし、ハイブリダイゼーションの最終的な結果は、改変しなかったオリゴヌクレオチドによって得られる結果と実質的に同じであろう。

これら改変の導入は、特性（例えば、ハイブリダイゼーションキネティクス、ハイブリッド形成の可逆性、オリゴヌクレオチドの生物学的安定性など）に陽性に影響を与えるために有利であり得る。

用語「固体支持体」は、オリゴヌクレオチドプローブがそのハイブリダイゼーション特性を保持し、ハイブリダイゼーションのバックグラウンドのレベルが低く保たれる限り、それが結合し得る任意の基材をいう。通常、この固体基材はマイクロタイタープレート、メンブラン（例えば、ナイロン若しくはニトロセルロース）またはマイクロスフェア（ビーズ）である。メンブランへの適用若しくは固定の前に、固定を容易にし、若しくはハイブリダイゼーション効率を改善するために、核酸プローブを改変することは好都合であり得る。そのような改変はホモポリマーテーリング、異なる反応基との結合（例えば

、脂肪族基、NH<sub>2</sub>基、SH基、カルボキシル基)、またはビオチン、ハプテン、若しくはタンパク質との結合を含む。

用語「ラベルした」とはラベルした核酸の使用をいう。ラベル化は、増幅のポリメラーゼ工程の間に組み込まれたラベルしたヌクレオチドの使用によって(例えば、Saiki et al., (1988)若しくはBej et al. (1990)によって例示されている)、またはラベルしたプライマーの使用により、あるいは当業者に公知の任意の他の方法により、行われてもよい。ラベルの性質はアイソトープ性(32 P、35 Sなど)であっても非アイソトープ性(ビオチン、ジゴキシゲニンなど)であってもよい。

「サンプル」は、感染したヒト(若しくは動物)、若しくは培養後のもの(濃縮物)のいずれかから直接採取した任意の生物学的物質でもよいし、あるいは食物または飼料から採取したサンプルでもよい。生物学的物質は、例えば、任意の種類の喀出物、気管支洗浄物(broncheolavages)、血液、皮膚組織、生検材料、リンパ球血液培養物質、コロニーなどでもよい。上記のサンプルは当該分野で公知の任意の技術によって調製若しくは抽出し得る。

これらのサンプル中の「標的」物質は、検出されるべき生物(=標的生物)のゲノムDNA若しくは前駆体RNA、あるいは上で説明したそれらの増幅物のいずれでもよい。より詳細には、標的物質の核酸配列は標的生物のスペーサー領域に局在する。

標的物質の検出および同定は、文献に記載され、当業者に現在公知の多くの電気泳動法、ハイブリダイゼーション法、若しくは配列決定法の1つを用いることによって行われ得る。しかし、生物学的サンプル中に存在する可能性のある核酸を同時に検出する非常に簡便で有利な技術は、ラインプローブアッセイ技術である。このラインプローブアッセイ(L i P A)は、メンブランストリップを用いるリバースハイブリダイゼーション形式(Saiki et al., 1989)であって、そのメンブラン上に、いくつかのオリゴヌクレオチドプローブ(ネガティブコントロールオリゴヌクレオチドおよびポジティブコントロールオリゴヌクレオチドを含む)を平行なラインとして簡便に載せることができる。

このL i P A技術は、Stuyver et al., (1993)および国際出願第WO 9 4 / 1 2 6 7 0号に記載されたように、非常に迅速で使用者にやさしいハイブリダイゼーションテストを提供する。結果は増幅の開始後4時間以内に読むことができる。増幅の間に、通常、非アイソトープ性ラベルが増幅産物に組み込まれ、その後、アルカリ変性させ、増幅産物をメンブラン上のプローブと接触させ、ハイブリダイゼーションを約1~1.5時間行う。結果として、形成されたハイブリッドは酵素的手法で検出され、目に見える紫-褐色沈殿物となる。このL i P A形式は、市販の走査機器と完全に適合性であり、したがって、結果を自動的に判定することが可能である。これらの全ての利点によりL i P A形式は機械的操作の設定で使用されやすくなっている。

このL i P A形式は、種レベルの病原体の同定および検出に有利な道具であるばかりでなく、より高度な若しくは低い分類上のレベルにも有利である。例えば、L i P Aストリップ上のプローブ配置は、それらが完全な属(例えば、Neisseria、Listeriaなど)を検出し得るか、属内の亜群(例えば、Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum複合体中の亜群)を同定し得るか、あるいは、ある場合には、種内のサブタイプ(亜種、血清型、シーケバール(sequevar)、生理学的性状型など、臨床上関連しているものは何でも)さえも検出し得る様な方法で選択される。

多くのプローブ数によって同時にハイブリダイゼーション結果を生じる能力はL i P A技術の際だった恩典である。多くの場合、特定の組み合わせのプローブによって得られる情報の量は、単一のプローブアッセイを用いることによって得られるデータに数で勝る。したがって、メンブランストリップ上のプローブの選択は極度に重要である。なぜなら、最適化されたプローブのセットは可能な限り最大の情報を生じるからである。このことは、本明細書中でより特定して例示する。

異なるプローブを1ストリップ上で併用し得るという事実は、検出される生物群の標的領域における配



列異質性による感度の欠除に好都合に対応する可能性を提供する。この異質性によって、2以上のプローブが特定の群の全ての生物を陽性に同定するために必要とされ得る。これらのプローブはメンブラストリップの異なる位置に載せられ得、結果は、これらのプローブの少なくとも1つが陽性的の場合、陽性として解釈される。あるいは、これらのプローブは、同じ位置に混合物として載せられ、それによりストリップ上のラインの数を減少させることになる。このように減少させることは、ストリップをより簡明にするために、若しくは1枚のストリップ上に載せるプローブの総数を増やすことができるようにするために、便利である。もう1つの別のアプローチは、その実用的な利点の観点から、2つ（またはそれ以上）の異なるプローブ（＝縮重したプローブ）の配列を有するオリゴヌクレオチドの合成であり、次いでそれらにさらに手を加えて1オリゴヌクレオチド分子としてストリップ上に載せることができる。このアプローチはL i P Aストリップの操作手順を著しく単純化する。例えば、AとBというヌクレオチド配列を有するプローブはどちらも、分類群Xの全ての株を検出するために必要とされる。後者の場合、ヌクレオチド配列ABを有するプローブを合成し得る。このプローブはプローブAとBとを合わせた特性を有するであろう。

上記の性質により、L i P Aシステムは、いくつかの生物がサンプル中で同時に検出される必要がある場合のハイブリダイゼーション法の好ましい形式と考えられ得る。さらに、実施例の項で記載するように、このL i P Aシステムは、理論的に設計されたプローブの実験的評価および選択のための好ましい形式である。

しかし、他の任意のハイブリダイゼーションアッセイ（それにより同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で異なるプローブが用いられる）も、上記の検出および／または選択方法として用いられ得ることは明確にされるべきである。例えば、標的核酸を固体支持体に固定して異なるプローブの混合物を用い、全てを別々にラベルすると、その標的にハイブリダイズしたそれぞれのプローブについて異なる検出シグナルを得ることも可能であり得る。

一例として、サンプル中の1以上の生物を検出するためにしたがるべきL i P A形式を用いる手順の概要を下記に記す：－最初に、サンプル中の検出すべき生物の核酸を増幅および／またはハイブリダイゼーションに利用できるようにする。

－2番目に、もしあれば、その核酸を、1つの若しくは別の標的増幅システムで以下のように増幅する。通常、増幅は次のハイブリダイゼーションシグナルを高めるために必要とされる。しかし、いくつかのサンプル若しくはいくつかの生物では増幅は不要である。形成されたハイブリッドの検出について、

高感度のシグナル増幅システムが用いられる場合には、そのとおりであり得る。

－3番目に、変性工程の後、最終的にサンプル中に存在する核酸若しくは得られた増幅産物を、その上に目的の生物の検出を可能にする1以上のDNAプローブを固定したL i P Aストリップと接触させハイブリダイゼーションを進行させる。

－最後に、洗浄工程を行った後、最終的に、ハイブリッドを簡便で適合性のある検出システムを用いて検出する。ハイブリダイゼーションシグナル若しくは観察したパターンから、その特定の生物学的サン

プル中のスクリーニングされた1つ若しくはいくつかの生物の存在若しくは不在を推定し得る。

用いた増幅システムは、必要とされる特定の適用に応じてほぼ汎用である。

rRNAスパーサーの保存された近接領域（16S遺伝子および23S遺伝子）内に位置するユニバーサルプライマーの使用により、ほとんどの、そうでなければ全ての真正細菌起源の生物のスパーサー領域が増幅される。同じ結果は、普遍性を低下させた異なるプライマーセットの組み合わせ（複合増幅（multiplex amplification））、すなわち、2以上のプライマーセットを1つの同じ反応混合物中で同

時に用いる増幅手法）を用いることによって得られ得る。

いくつかの適用については、サンプル中の全ての生物ではなく、より特定の、予め決めた分類群を増幅

することが適切である。これは、スパーサーの近接遺伝子の保存度の低い部分の中（例えば、マイコバクテリアのスパーサー領域の増幅のためのMYCP1-5）あるいはスパーサーそれ自体の中（例えば、それぞれListeria種、Brucella種、Chlamydia trachomatis、およびYersinia enterocoliticaのスパーサー領域の特異的増幅のためのLis-P1-P7、BRU-P1-4、CHTR-P1-2、およびYEC-P1-2）のいずれかに位置する特定のプライマーを用いて達成され得る。

したがって、本発明は、サンプル中の少なくとも1つの微生物の検出および同定方法、若しくはいくつかの微生物を同時に検出する方法であって、以下の工程：(i) 必要なら、サンプル中の検出されるべき

微生物からポリ核酸を放出させ、単離および／または濃縮する工程；

(ii) 必要なら、検出されるべき微生物由来の16S-23S rRNAスパーサー領域若しくはその一部を少なくとも1つの適切なプライマー対を用いて増幅する工程；

(iii) 工程(ii)若しくは(iii)のポリ核酸を、少なくとも2つのプローブを含むプローブのセットと、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下でハイブリダイズさせる工程、ここで、上記プローブは表1aの配列若しくはその等価物から選択されるか、および／または図1～103に示した任意のスパーサー配列から誘導された分類群特異的のプローブから選択され、上記分類群特異的のプローブは、表1aの少なくとも1つのプローブと同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下でハイブリダイズし得るように選択される；

(iv) 工程(iii)で形成されたハイブリッドを検出する工程；

(v) 工程(iv)で得られた特異なハイブリダイゼーションシグナルからサンプル中に存在する微生物を同定する工程を包含する方法を提供する。

表1aに記載したプローブは、全て、それらが50℃のハイブリダイゼーションおよび洗浄温度で、3×SSCおよび20%ホルムアミドという好ましいハイブリダイゼーションおよび洗浄培地中で所望のハイブリダイゼーション特性を示すような方法で選択された。

プローブの「等価物」という用語はまた、「変種」若しくは「ホモログ」若しくは「自明な誘導体」とも呼ばれ、その等価物が、対応する改変されていないプローブ配列と同じRNA若しくはDNA標的とハイブリダイズする限り、1つまたはいくつかのヌクレオチドの任意のそれらの末端への付加若しくはそれからの除去のいずれかにより、またはその配列内の1以上のヌクレオチドの変更に、あるいはその両方の組み合わせにより、表1に特定された任意のプローブと配列が異なるプローブをいう。上記等価物は、対応する改変されていないプローブ配列と、少なくとも75%の相同性、好ましくは80%以上の相同性、最も好ましくは85%以上の相同性を共有している。プローブの等価物を用いる場合、対応する改変していないプローブと同じ特異性を得るためにハイブリダイゼーション条件を改変することが必要であることを銘記すべきである。結局、本発明の目的は、同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で働くプローブのセットを用いることなので、もとの改変されていないプローブと同じセットに属する他のプローブの配列にしたがって改変することもまた必要であろう。これらの改変は、当業者に公知の原則、例えば、Hames Band Higgins S(Eds):Nucleic acid hybridization.

Practical approach. IRL Press, Oxford, UK, 1985 に記載された原則にしたがって行うことができる。本発明はまた、分類群特異的のプローブをその分類群のスパーサー領域配列から選択する方法を提供し、

それらのプローブは、それらが統一されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で所望のハイブリダイゼーション特性を示すように選択される。

用語「統一された」条件は、これらの条件が異なる分類群の検出を可能にする異なるプローブに対しても同一であることを意味する。

好ましくは、本発明は、最終的に2つの微生物を同時に検出する上記の方法を提供する。

好ましい実施態様においては、工程(iii)に記載されたプローブのセットは、表1aの配列から選択された少なくとも2つのプローブ若しくはその等価物を含む。

別の実施態様においては、工程 (iii) に記載されたプローブのセットは、表 1 a の配列から選択された少なくとも 1 つのプローブ若しくはその等価物、および図 1 ～ 1 0 3 に示された任意のスペーサー配列から誘導された少なくとも 1 つの分類群特異的プローブを含む。

さらに別の実施態様においては、工程 (iii) に記載されたプローブのセットは、図 1 ～ 1 0 3 に示された任意のスペーサー配列から誘導された少なくとも 2 つの分類群特異的プローブを含む。

本発明はまた上記の方法であって、工程 (iii) で特定されたプローブを少なくとも 1 つの別のプローブ、好ましくはやはり 1 6 S - 2 3 S r RNA スペーサー領域由来のプローブと組み合わせて、同じサンプル中に存在しがちな異なる病原体細菌の同時検出を可能にする方法を提供する。

生物学的サンプル中に存在する臨床関連のある生物は、サンプルの起源に依存して著しく変化し得る。最も一般的な病原体細菌は以下のものであり、喀出サンプル、若しくは気道起源のサンプルに見いだされ得る：

- *Moraxella catarrhalis* - *Streptococcus pneumoniae* - *Haemophilus influenzae* - *Pseudomonas aeruginosa* - *Mycoplasma pneumoniae* - *Acinetobacter* 種 - *Mycobacterium* 種 - *Staphylococcus aureus* - *Legionella pneumophila* ほとんど、そうでなければ全てのこれらの生物の検出を可能にするスペーサープローブを有する L i P A ストリップは、上に説明した理由により非常に利点がある。明らかに、これは他の生物学的サンプル、例えば、脳脊髄液、尿生殖器管サンプル、胃腸管サンプル、血液、尿、食品、土壌、などにも適応する。例えば、脳脊髄液の好ましいパネルは、以下の生物の検出および分別を可能にするプローブの組み合わせを含む：

- *Neisseria meningitidis* - *Streptococcus pneumoniae* - *Streptococcus agalactiae* - *Listeria monocytogenes* - *Mycobacterium tuberculosis* いくつかの上記の生物については、スペーサープローブはすでに以前の特許出願 (WO 9 1 / 1 6 4 5 4) において設計されている。サンプル中に存在する可能性のあるほとんどの病原体を一回のテストで検出し得るために、本発明のプローブは WO 9 1 / 1 6 4 5 4 のプローブの少なくとも 1 つ、若しくは WO 9 1 / 1 6 4 5 4 において特定されたそれらの自明な誘導体と組み合わせてもよい。

明確化のため、これらのプローブを以下に挙げる：したがって、本発明は上記の方法を提供し、ここで前記のサンプルは気道由来であり、そして工程 (iii) で定義したプローブのセットは以下のスペーサープローブ：そして、より好ましくは以下のスペーサープローブ：から選択される少なくとも 1 つのプローブ若しくはそのプローブの等価物を含むか、および/またはこのプローブのセットは、上記サンプル中の検出されるべき微生物の 1 つに対応するスペーサー領域配列から誘導された少なくとも 1 つの分類群特異的プローブを含み、上記スペーサー領域配列は SEQ ID NO 7 6 ～ 1 0 6、1 5 7 ～ 1 7 4、1 2 4、1 2 5、1 1 1 ～ 1 1 5、1 3 9 ～ 1 4 4、若しくは 1 2 6 ～ 1 3 0 によって示される任意の配列から選択され、上記プローブ若しくは等価物は以下の生物の少なくとも 1 つを検出する任意のプローブと組み合わせて用いてもよい：*Haemophilus influenzae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Moraxella catarrhalis*、若しくは *Bordetella pertussis*。

上記の本発明のプローブは、*Mycobacterium* 種 (SEQ ID NO 1 ～ 3 3 および 1 7 5 ～ 1 9 1)、

*Pseudomonas aeruginosa* (SEQ ID NO 3 4 ～ 3 8)、*Mycoplasma* 種 (SEQ ID NO 4 9 ～ 5 2)、

*Staphylococcus aureus* (SEQ ID NO 5 3 ～ 5 6)

、および *Acinetobacter baumannii* (SEQ ID NO 5 7 および 5 8) の検出のために設計される。

好ましくは、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ若しくはそれ以上の上記プローブを同時に用いる。

本発明はまた、上記の方法に関し、ここで、上記のサンプルは脳脊髄液から取り出され、そして工程 (iii) で定義したプローブのセットは、以下のスペーサープローブ：そして、より好ましくは以下のスペーサープローブ：から選択される少なくとも 1 つのプローブ若しくはこのプローブの等価物を含むか

、および/またはこのプローブのセットは、上記サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応する  
 スペース領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プローブを含み、上記スペース領  
 域配列はSEQ ID NO116、118～121、若しくは213～215によって示される任意の配列か  
 ら選択され、上記プローブ若しくは等価物は以下の生物の少なくとも1つを検出する任意のプローブと  
 組み合わせて用いてもよい：*Neisseria meningitidis*、*Haemophilus influenzae*、若しくは

*Streptococcus pneumoniae*。

上記の本発明のプローブは、*Mycobacterium*種、より特定すると*Mycobacterium tuberculosis* (SEQ ID  
 NO1～5)、および*Listeria*種、より特定すると*Listeria monocytogenes* (SEQ ID NO39～42)の  
 検出のために設計される。

好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくはそれ以上の上記プローブ  
 を同時に用いる。

本発明はまた、上記の方法に関し、ここで、上記のサンプルは尿生殖器管から採取され、そして工程

(iii)で記載したプローブのセットは、以下のスペースプローブ：から選択される少なくとも1つの  
 プローブ若しくは該プローブの等価物を含むか、および/またはこのプローブのセットは、上記サン  
 プル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペース領域配列から誘導された少なくとも1つの分  
 類群特異的プローブを含み、上記スペース領域配列はSEQ ID NO122、123、197、124若  
 しくは125によって示される任意の配列から選択され、上記プローブ若しくは等価物は以下の生物の  
 少なくとも1つを検出する任意のプローブと組み合わせて用いてもよい：*Neisseria gonorrhoeae*、

*Haemophilus ducreyi* 若しくは*Streptococcus agalactiae*。

上記の本発明のプローブは、*Chlamydia*種 (SEQ ID NO45～48および201)、および*Mycoplasma*種  
 (SEQ ID NO51および52)の検出のために設計される。

好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ若しくは7つの上記プローブを同時に用いる。  
 本発明はまた、上記の方法に関し、ここで、上記のサンプルは食物から採取され、そして工程(iii)で

定義したプローブのセットは、以下のスペースプローブ：そして、より好ましくは以下のスペース  
 プローブ：から選択される少なくとも1つのプローブ若しくは該プローブの等価物を含むか、および/  
 またはこのプローブのセットは、上記サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するスペース  
 領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プローブを含み、上記スペース領域配列は  
 SEQ ID NO116、118～121、213～215、139～144、131、132、154、1  
 33～138、195若しくは196によって示される任意の配列から選択され、上記プローブ若しく  
 は等価物は*Campylobacter*種の株を検出する任意のプローブと組み合わせて用いてもよい。

上記の本発明のプローブは、*Listeria*種 (SEQ ID NO39～44) *Staphylococcus*種 (SEQ ID NO53～  
 56)、*Brucella*種 (SEQ ID NO59、60、193および194)、*Salmonella*種 (SEQ ID NO61～  
 64) および*Yersinia enterocolitica* (SEQ ID NO198～200)の検出のために設計される。

好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくはそれ以上の上記プローブ  
 を同時に用いる。

本発明はまた、上記の方法に関し、ここで、上記のサンプルは患者の胃腸管から採取され、そして工程

(iii)で定義したプローブのセットは、以下のスペースプローブ：そして、より好ましくは以下のス  
 ペースプローブ：から選択される少なくとも1つのプローブ若しくは該プローブの等価物を含むが、  
 および/またはこのプローブのセットは、上記サンプル中の検出されるべき微生物の1つに対応するス  
 ペース領域配列から誘導された少なくとも1つの分類群特異的プローブを含み、上記スペース領域  
 配列はSEQ ID NO133～138若しくは195～196によって示される任意の配列から選択され、  
 上記プローブ若しくは等価物は*Campylobacter*種を検出する任意のプローブと組み合わせて用いてもよ

い。

上記の本発明のプローブは、*Salmonella*種 (SEQ ID NO 61～64) および *Yersinia enterocolitica* (SEQ ID NO 198～200) の検出のために設計される。  
好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、若しくは7つの上記プローブを同時に用いる

本発明はまた、特定の細菌分類群のために選択されたプローブ若しくはその等価物の用途に関し、上記分類群は、完全な属、若しくは属内の亜群、種、若しくはさらに種内のサブタイプのいずれかである。したがって、本発明は、サンプル中の1以上の *Mycobacterium* 種および亜種を検出しそして同定する上記のような方法を提供する。ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：そして、より好ましくは以下の制限されたグループのスーパープローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 76～110 若しくは 157～174 から誘導した任意のプローブであって、

*Mycobacterium* 種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。SEQ ID NO 76～110 および 157～174 で示される配列は新規である。  
好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくはそれ以上の上記プローブを同時に用いる。

上記のように、好ましい制限されたプローブのセットは、80%以上の、好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の感度および特異性を、実施例の項で記載する特定のハイブリダイゼーション条件下で示すプローブである。

1つの特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の *Mycobacterium tuberculosis* 複合体を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 76 から誘導した任意のプローブであって、*M. tuberculosis* 複合体と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。*M. tuberculosis* 複合体は、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG、*M. africanum* および *M. microti* 株を含む。

SEQ ID NO 76 に示す配列は新規である。

好ましくは、少なくとも2つ若しくは3つの上記プローブを同時に用いる。

別の特定の実施態様においては、本発明は、MAIS 複合体由来の1以上の *Mycobacterium* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 77～100 若しくは 108～110 から誘導した任意のプローブであって、MAIS 複合体由来の株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。本発明において定義されるMAIS複合体は、*M. avium*、

*M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* および上記の種に非常に近接して関連し、別の定義された

*Mycobacterium* 種にははっきりとは属していない全ての株を含む。後者の群の株は本発明では「MIC株」(*M. intracellulare* 複合体) と定義する。

好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくはそれ以上の上記プローブを同時に用いる。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の *M. avium* および

*M. paratuberculosis* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 77 および 78 から誘導した任意のプローブであって、*M. avium* 若しくは *M. paratuberculosis* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 77 および 78 に示す配列は新規である。

好ましくは、この実施態様は両プローブを組み合わせて用いる。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の *Mycobacterium*

*intracellulare* 株および *M. I C* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 79

、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98若しくは99から誘導した任意のプロープであって、*Mycobacterium intracellulare*株およびM I C株と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
SEQ ID NO79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98若しくは99に示した配列は新規である 好ましくは、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ若しくはそれ以上の上記プロープを同時に用いる。さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium intracellulare*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は少なくとも下記のプロープ：若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO89から誘導した任意のプロープであって、*M. intracellulare*株と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium scrofulaceum*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は少なくとも下記のプロープ：若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO100から誘導した任意のプロープであって、*M. scrofulaceum*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
SEQ ID NO100に示した配列は新規である。  
さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium kansasii*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプロープ：そして、より好ましくは：の少なくとも1つ若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO101、167、168若しくは169から誘導した任意のプロープであって、*M. kansasii*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
SEQ ID NO101、167、168および169に示した配列は新規である。  
好ましくは、少なくとも2つ、3つ若しくは4つの上記プロープを同時に用いる。  
さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium chelonae*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプロープ：の少なくとも1つ若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO102、103、若しくは174から誘導した任意のプロープであって、*M. chelonae*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。他の好ましい実施態様にしたがって、これらの3つのプロープを組み合わせる。用いる。  
SEQ ID NO102、103、および174に示した配列は新規である。  
さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium gordonae*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプロープ：そして、より好ましくは：の少なくとも1つ若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO104、105、若しくは106から誘導した任意のプロープであって、*M. gordonae*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
SEQ ID NO104~106に示した配列は新規である。  
好ましくは、少なくとも2つ若しくは3つの上記プロープを同時に用いる。  
さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の1以上の*Mycobacterium ulcerans*株若しくは*Mycobacterium marinum*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプロープ：若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO157から誘導した任意のプロープであって、*M. ulcerans*および*M. marinum*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 5 7 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium genavense* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも 1 つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1 若しくは 1 6 2 から誘導した任意のプローブであって、*M. genavense* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 5 8 ～ 1 6 2 に示した配列は新規である。

実施例に記載するように、*M. genavense* は、狭義の (*sensu strictu*) *M. genavense* および *M. simiae* 様と呼ばれる非常に関連のある群を含む。前者の株の群は、MGV-ICG-1 プローブで特異的に検出され得るが、一方後者の群は、MGV-ICG-3 プローブと特異的にハイブリダイズする。MGV-ICG-2 プローブはどちらの群も検出する。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium xenopi* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 6 3 から誘導した任意のプローブであって、*M. xenopi* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 6 3 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium simiae* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 6 4 若しくは 1 6 5 から誘導した任意のプローブであって、*M. simiae* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 6 4 若しくは 1 6 5 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium fortuitum* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも 1 つ若しくは上記プローブの等価物と、または SEQ ID NO 1 6 6 から誘導した任意のプローブであって、*M. fortuitum* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 6 6 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium celatum* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 7 0 から誘導した任意のプローブであって、*M. celatum* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 7 0 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium haemophilum* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 7 1、1 7 2 若しくは 1 7 3 から誘導した任意のプローブであって、*M. haemophilum* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 7 1 ～ 1 7 3 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium malmoeense* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも 1 つ若しくは上記プローブの等価物と、および／または SEQ ID NO 1 0 7 から誘導した任意のプローブであって、*M. malmoeense* と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 1 0 7 に示した配列は新規である。

さらに別の特定の実施態様においては、本発明は、サンプル中の 1 以上の *Mycobacterium* 株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程 (iii) は下記のプローブ：の少なくとも 1 つ若しくは上記プローブの等価物と、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

好ましい実施態様によれば、両プローブを組み合わせ用いる。  
 本発明はまた、サンプル中の1以上のMycoplasma株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 124若しくは125から誘導した任意のプローブであって、Mycoplasma種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
 好ましくは少なくとも2つ、3つ、若しくは4つの上記プローブを同時に用いる。  
 より特定すると、本発明は、サンプル中の1以上のMycoplasma pneumoniae株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 125から誘導した任意のプローブであって、Mycoplasma pneumoniaeと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。好ましい実施態様によれば、これらの両プローブを組み合わせ用いる。  
 SEQ ID NO 125に示した配列は新規である。  
 別の実施態様において、本発明は、サンプル中の1以上のMycoplasma genitalium株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は少なくとも下記のプローブ：若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 124から誘導した任意のプローブであって、Mycoplasma genitaliumと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
 SEQ ID NO 124に示した配列は新規である。  
 本発明は、サンプル中の1以上のPseudomonas株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 111、112、113、114若しくは115から誘導した任意のプローブであって、Pseudomonas株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
 SEQ ID NO 111~115に示した配列は新規である。  
 好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ、若しくは4つを同時に用いる。  
 より特定すると、本発明は、サンプル中の1以上のPseudomonas aeruginosa株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：そして、より好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 111から誘導した任意のプローブであって、Pseudomonas aeruginosaと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
 SEQ ID NO 111に示した配列は新規である。  
 好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ、4つ若しくは5つを同時に用いる。  
 本発明は、サンプル中の1以上のStaphylococcus種を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 139、140、141、142、143若しくは144から誘導した任意のプローブであって、Staphylococcus種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。  
 SEQ ID NO 139~144に示した配列は新規である。  
 好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ、若しくは4つを同時に用いる。  
 より特定すると、本発明は、サンプル中の1以上のStaphylococcus aureus株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ、好ましくは両方、若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 139、140、141、142、若しくは143から誘導した任意のプローブであって、Staphylococcus aureusと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。好ましい実施態様によれば、これらの両プローブを組み合わせ用いる。  
 別の特定の態様において、本発明は、サンプル中の1以上のStaphylococcus epidermidis株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)はSEQ ID NO 144から誘導した任意のプローブであって、Staphylococcus epidermidisとの特異的なハイブリダイズを引き起こすプローブと、



ハイブリダイズさせる工程を包含する。

本発明は、サンプル中の1以上のAcinetobacter株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 126、127、128、129若しくは130から誘導した任意のプローブであって、Acinetobacter種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

好ましい実施態様によれば、これら両プローブを組み合わせて用いる。

SEQ ID NO 126～130に示した配列は新規である。

より特定すると、本発明は、サンプル中の1以上のAcinetobacter baumannii株を検出しそして同定する

上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 126から誘導した任意のプローブであって、Acinetobacter baumanniiと特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。好ましい

実施態様によれば、これら両プローブを組み合わせて用いる。

本発明はまた、サンプル中の1以上のListeria株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで

、工程(ii)は下記のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 116、118、119、120、121、213、214若しくは215から誘導した任意のプローブであって、Listeria種と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

実施例の項に記載するように、Listeria種は、狭義の(sensu strictu)Listeria種および「Listeria様生物」と呼ばれる非常に関連のある群を含む。後者の群は、LISP-ICG-1 プローブによって特異的に認識される。

SEQ ID NO 116、118～121、および213～215に示した配列は新規である。

好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ若しくは6つを同時に用いる。

より特定すると、本発明はまた、サンプル中の1以上のListeria monocytogenes株を検出しそして同定

する上記の方法を提供し、ここで、工程(iii)は下記のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 120から誘導した任意のプローブであって、Listeria monocytogenesと特異的にハイブリダイズするプローブと、

ハイブリダイズさせる工程を包含する。

好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ若しくは3つを同時に用いる。

本発明はまた、サンプル中の1以上のBrucella株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで

、工程(iii)は下記のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 131、132、若しくは154から誘導した任意のプローブであって、Brucella株と特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 131、132および154に示した配列は新規である。

本発明はまた、サンプル中の1以上のSalmonella株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、こ

で、工程(iii)は下記のプローブ：そして、最も好ましくは以下のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 133、134、135、136、137若しくは138から誘導した任意のプローブであって、Salmonella株と特異的にハイブリダイズするプロー

ブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 133～138に示した配列は新規である。

好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ若しくは4つを同時に用いる。

本発明はまた、サンプル中の1以上のChlamydia株を検出しそして同定する上記の方法に関し、ここで

、工程(iii)は下記のプローブ：の少なくとも1つ若しくは上記プローブの等価物と、および/またはSEQ ID NO 122、123若しくは197から誘導した任意のプローブであって、Chlamydia株と特異

的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

好ましくは上記のプローブの少なくとも2つ、3つ、4つ若しくは5つを同時に用いる。

より特定すると、本発明はまた、サンプル中の1以上の*Chlamydia trachomatis*を検出しそして同定する上記の方法に関し、ここで、工程(ii)は下記のプロープ：の少なくとも1つ若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO 123若しくは197から誘導した任意のプロープであって、*Chlamydia trachomatis*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 123および197に示した配列は新規である。

好ましくは上記のプロープの少なくとも2つ、3つ、若しくは4つを同時に用いる。

別の特定の実施態様において、本発明は、サンプル中の1以上の*Chlamydia psittaci*株を検出しそして

同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は少なくとも下記のプロープ：若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO 122から誘導した任意のプロープであって、*Chlamydia psittaci*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 122に示した配列は新規である。

本発明は、サンプル中の1以上の*Streptococcus*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)はSEQ ID NO 145、146、147、148、149、150、151、152、若しくは153から誘導した任意のプロープであって、*Streptococcus*株若しくはこれらのプロープの等価物と、特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 145、146、147、148、149、150、151、152若しくは153に示した配列は新規である。

本発明はまた、サンプル中の1以上の*Yersinia enterocolitica*株を検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は下記のプロープ：の少なくとも1つ若しくは上記プロープの等価物と、および/またはSEQ ID NO 195若しくは196から誘導した任意のプロープであって、*Yersinia enterocolitica*と特異的にハイブリダイズするプロープと、ハイブリダイズさせる工程を包含する。

SEQ ID NO 195および196に示した配列は新規である。

いくつかの場合においては、サンプル中に存在する全ての生物ではなく、関連があると考えられるより特定の分類群のみを増幅することが有利である。このような場合には、本発明は、これらの予め決めた分類群のみのためのスパーサー領域の特異的な増幅を可能にするプライマーを提供する。

したがって、本発明は、サンプル中の*Chlamydia trachomatis*を特異的に検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は、下記プライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16S-23S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、前記等価物は、その等価物が*Chlamydia trachomatis*由来のスパーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーとは配列が異なっている。

好ましくは両プライマーを用いる。

本発明はまた、サンプル中の*Listeria*種を特異的に検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は、下記プライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16S-23S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、前記等価物は、その等価物が*Listeria*種由来のスパーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーとは配列が異なっている。

本発明はまた、サンプル中の*Mycobacterium*種を特異的に検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は、下記プライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16S-23S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、前記等価物は、その等価物が*Mycobacterium*種由来のスパーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーとは配列が異なっている。

本発明はまた、サンプル中の*Brucella*種を特異的に検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は、下記プライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、1

6 S-23 S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、前記等価物は、その等価物が*Brucella*種由来のスパーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーとは配列が異なっている。

本発明はまた、サンプル中の*Yersinia enterocolitica*種を特異的に検出しそして同定する上記の方法を提供し、ここで、工程(ii)は、下記のプライマー：の少なくとも1つ若しくはそれらプライマーの等価物を用いる、16 S-23 S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を包含し、前記等価物は、その等価物が*Yersinia enterocolitica*種由来のスパーサー領域若しくはその一部をなお特異的に増幅するものであって、1以上のヌクレオチドの変化により上記プライマーとは配列が異なっている。

本発明はまた、上記に定義された少なくとも1つのプローブおよび/またはプライマーを含む組成物を提供する。

前記組成物は、プローブ若しくはプライマーのための当該分野で公知の任意の担体、支持体、ラベル若しくは希釈物、より特定すると、用語の定義で詳述した任意のラベル若しくは支持体を含んでもよい。本発明は、より特定すると、上記で定義した単離されたプローブおよびプライマーに関し、さらに特定

すると、表1aに特定された任意のプローブ若しくは表1bに特定された任意のプライマーに関する。別の実施態様によれば、本発明はまた、上記で定義され、そして図1~103に記載された新規なスパーサー領域配列 (SEQ ID NO 76~154、SEQ ID NO 157~174、SEQ ID NO 195~197およびSEQ ID NO 213~215)に関する。

別の実施態様において、本発明は、上で定義した任意のプローブを含むリバースハイブリダイゼーション法を提供する。ここで、このプローブは固体支持体の既知の場所、より好ましくは、メンブランストリップ上に固定されている。

さらに別の実施態様において、本発明は、サンプル中の、少なくとも1つの微生物を検出しそして同定するための、若しくはいくつかの微生物を同時に検出しそして同定するための、以下の成分を含むキットを提供する：(i) 適切なら、インターシストロニックな16 S-23 S rRNAスパーサー領域若しくはその一部の増幅を可能にする少なくとも1つの適切なプライマー対；

(ii) 上で定義した少なくとも1つのプローブ；

(iii) 前記プローブとサンプル中のポリ核酸またはそれらの増幅産物とのハイブリダイゼーション

反応を可能にする緩衝液、若しくは緩衝液を作成するのに必要な成分、；

(iv) 適切な洗浄条件下での形成されたハイブリッドの洗浄を可能にする溶液、若しくはその溶液を

作成する成分；

(v) 適切なら、前記のハイブリダイゼーションの結果得られたハイブリッドを検出する手段。

図面の説明図1：*Mycobacterium tuberculosis* H37RV株ATCC 27294 由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 76)を示す。

図2：*Mycobacterium avium* ATCC 151.769 (ITG4991) 由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 77)を示す。

図3：*Mycobacterium paratuberculosis* 316F株および 2E株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 78)を示す。

図4：*Mycobacterium* ITG 5513 株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 79)を示す。

図5：*Mycobacterium* ITG 8695株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 80)を示す。

図6：*Mycobacterium* ITG 8708株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 81)を示す。

図7：*Mycobacterium* ITG 8715 株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 82)を示す。

図8：*Mycobacterium* ITG 8054 株由来の16 S-23 S rRNAスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 83)を示す。

- 図9: *Mycobacterium* ITG 8737 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 84) を示す。
- 図10: *Mycobacterium* ITG 8743 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 85) を示す。
- 図11: *Mycobacterium* ITG 8745 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 86) を示す。
- 図12: *Mycobacterium* ITG 8748 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 87) を示す。
- 図13: *Mycobacterium* ITG 8752株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 88) を示す。
- 図14: *Mycobacterium intracellulare* serovar 12 ITG 5915 由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 89) を示す。
- 図15: *Mycobacterium lufu* ITG 4755 由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 90) を示す。
- 図16: *Mycobacterium* ITG 5922 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 91) を示す。
- 図17: *Mycobacterium* ITG 1329 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 92) を示す。
- 図18: *Mycobacterium* ITG 1812 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 93) を示す。
- 図19: *Mycobacterium* ITG 5280 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 94) を示す。
- 図20: *Mycobacterium* ITG 5620 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 95) を示す。
- 図21: *Mycobacterium* ITG 5765 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 96) を示す。
- 図22: *Mycobacterium* ITG 7395 株由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 97) を示す。
- 図23: *Mycobacterium* ITG 8738 由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 98) を示す。
- 図24: *Mycobacterium* ITG 926 由来の16S-23S rRNAスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 99) を示す。
- 図25: *Mycobacterium scrofulaceum* ITG 4988 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 100) を示す。
- 図26: *Mycobacterium kansasii* ATCC 22478 (=ITG4987) 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 101) を示す。
- 図27: *Mycobacterium chelonae* abcessus ITG 4975由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 102) を示す。
- 図28: *Mycobacterium chelonae chelonae* ITG 9855由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 103) を示す。
- 図29: *Mycobacterium gordonae* ITG 7703 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 104) を示す。
- 図30: *Mycobacterium gordonae* ITG 7836 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 105) を示す。
- 図31: *Mycobacterium gordonae* ITG 8059 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 106) を示す。
- 図32: *Mycobacterium malmoeense* ITG 4842およびITG 4832 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 107) を示す。
- 図33: *Mycobacterium* 8757株由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 108) を示す。

図34: *Mycobacterium* ITG 8723 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 109) を示す。

図35: *Mycobacterium* ITG 8724 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 110) を示す。

図36: *Pseudomonas aeruginosa* UZG 5669 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 111) を示す。

図37: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 112) を示す。

図38: *Pseudomonas stutzeri* LMG 2333 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 113) を示す。

図39: *Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 114) を示す。

図40: *Pseudomonas putida* LMG 2232 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 115) を示す。

図41: *Listeria ivanovii* CIP 7842 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 117) を示す。

図42: *Listeria monocytogenes* 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 116) を示す。

図43: *Listeria seeligeri* serovar 4A nr. 4268 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 118) を示す。

図44: *Listeria ivanovii* CIP 7842の長いスペーサー領域の部分配列由来の16S-23Sの大きなスペーサー領域の部分DNA配列 (SEQ ID NO 119) を示す。

図45: *Listeria monocytogenes* IHE serovar 4B由来の16S-23Sの大きなスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 120) を示す。

図46: *Listeria seeligeri* serovar 4A nr. 4268 由来の16S-23Sの大きなスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 121) を示す。

図47: *Chlamydia psittaci* 6BC由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 122) を示す。

図48: *Chlamydia trachomatis* 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 123) を示す。

図49: *Mycoplasma genitalium* (U. Gobel) 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 124) を示す。

図50: *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 29432 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 125) を示す。

図51: *Acinetobacter baumannii* LMG 1041 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 126) を示す。

図52: *Acinetobacter calcoaceticus* LMG 1046 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 127) を示す。

図53: *Acinetobacter haemolyticus* LMG 996 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 128) を示す。

図54: *Acinetobacter johnsonii* LMG 999 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 129) を示す。

図55: *Acinetobacter junii* LMG 998 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 130) を示す。

図56: *Brucella melitensis* NIDO Biovar 1 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 131) を示す。

図57: *Brucella suis* NIDO Biovar 1 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 132) を示す。

図58: *Salmonella dublin* 由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 133) を示す。

- 図59: *Salmonella dublin*由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 134) を示す。
- 図60: *Salmonella enteritidis*由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 135) を示す。
- 図61: *Salmonella enteritidis*由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 136) を示す。
- 図62: *Salmonella typhimurium*由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 137) を示す。
- 図63: *Salmonella typhimurium*由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 138) を示す。
- 図64: *Staphylococcus aureus* UZG 572株8由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 139) を示す。
- 図65: *Staphylococcus aureus* UZG 6289 株由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 140) を示す。
- 図66: *Staphylococcus aureus* UZG 6289 株由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 141) を示す。
- 図67: *Staphylococcus aureus* UZG 6289 株由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 142) を示す。
- 図68: *Staphylococcus aureus* UZG 6289 株由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 143) を示す。
- 図69: *Staphylococcus epidermidis* UZG CNS41 株由来の16S-23Sスペーサー領域の1つのDNA配列 (SEQ ID NO 144) を示す。
- 図70: *Streptococcus mitis* UZG 2465 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 145) を示す。
- 図71: *Streptococcus pyogenes* UZG 3671 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 146) を示す。
- 図72: *Streptococcus sanguis* UZG 1042 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 147) を示す。
- 図73: *Streptococcus saprophyticus* UZG CNS46 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 148) を示す。
- 図74: *Streptococcus species* UZG 536 (84) 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 149) を示す。
- 図75: *Streptococcus species* UZG 4341 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 150) を示す。
- 図76: *Streptococcus species* UZG 457 (44B) 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 151) を示す。
- 図77: *Streptococcus species* UZG 97A由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 152) を示す。
- 図78: *Streptococcus species* UZG 483 (76) 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 153) を示す。
- 図79: *Brucella abortus* N100 Tulya biovar 3 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 154) を示す。
- 図80: *Mycobacterium ulcerans* ITG 1837および*Mycobacterium marinum* ITG 7732 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 157) を示す。
- 図81: *Mycobacterium genavense* ITG 8777 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 158) を示す。
- 図82: *Mycobacterium genavense* ITG 92-742 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 159) を示す。
- 図83: *Mycobacterium genavense* ITG 9500 由来の16S-23Sスペーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 160) を示す。

図84: *Mycobacterium simiae*様 ITG 7379 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 161) を示す。

図85: *Mycobacterium simiae*様 ITG 9745由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 162) を示す。

図86: *Mycobacterium xenopi* ITG 4986 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 163) を示す。

図87: *Mycobacterium simiae* A ITG 4485 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 164) を示す。

図88: *Mycobacterium simiae* B ITG 4484 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 165) を示す。

図89: *Mycobacterium fortuitum* ITG 4304 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 166) を示す。

図90: *Mycobacterium kansasii* ITG 6328 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 167) を示す。

図91: *Mycobacterium kansasii* ITG 8698 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 168) を示す。

図92: *Mycobacterium kansasii* ITG 8973 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 169) を示す。

図93: *Mycobacterium celatum* ITG 94-123 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 170) を示す。

図94: *Mycobacterium haemophilum* ITG 776 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 171) を示す。

図95: *Mycobacterium haemophilum* ITG 778 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 172) を示す。

図96: *Mycobacterium haemophilum* ITG 3071 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 173) を示す。

図97: *Mycobacterium chelonae* ITG 94-330 およびITG 94-379 由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 174) を示す。

図98: *Yersinia enterocolitica* P95 株由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 195) を示す。

図99: *Yersinia enterocolitica* P95 株由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 196) を示す。

図100: *Chlamydia trachomatis* SSDZ 94 M 1961 株由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 197) を示す。

図101: *Listeria*様MB 405 単離体由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 213) を示す。

図102: *Listeria*様MB 405 単離体由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 214) を示す。

図103: *Listeria*様MB 405 単離体由来の16S-23Sスパーサー領域のDNA配列 (SEQ ID NO 215) を示す。

表の説明表1a: 16S-23S rRNAスパーサー領域を起源とする新規プローブのリスト表1b: スパーサー領域若しくはその一部の分類群特異的増幅に用いられる可能性のあるプライマーのリスト

表2: *Pseudomonas*についてのハイブリダイゼーションの結果。

表3: マイコバクテリアの株タイプについて得られた異なるプローブパターン。

表4: LIPAでテストしたマイコバクテリア株。

表5: *Listeria* (プローブLM01, 2, LSE1, LIV1, LIS1) についてのハイブリダイゼーションの結果。

表6: *Listeria* (プローブLM03, LIS1) についてのハイブリダイゼーションの結果。

表7: *Chlamydia*についてのハイブリダイゼーションの結果。

表8: 新規なマイコバクテリアのプローブとハイブリダイゼーションの結果表9: *Brucella*についての

ハイブリダイゼーションの結果。

表10: *Staphylococcus*についてのハイブリダイゼーションの結果。

実施例1 : *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas aeruginosa*は、通常は重篤な潜在的疾患に関連している重要なヒトの病原体である。これはまた、院内感染の主な原因であり、その特徴として抗菌剤に抵抗する傾向がある。このグラム陰性の非発酵性の桿菌は、創傷感染、菌血症、気道および尿路感染症のような異なる臨床症状の原因でもあり得、また、嚢胞性線維症の患者における罹病および死亡の主要な原因でもある。

*Pseudomonas*種は、現在、増殖の特徴および幾つかの生物化学的特性に基づき識別されており、このため、病原体の正しい同定をするために24~72時間かかっている。

既にモノクローナルまたはポリクローナル抗体の開発により、*Pseudomonas*種の同定は著しく改善された。しかし最近、標的DNAを前もって増幅して、または増幅せずに、DNAプローブを使用する非常に高感度で特異的な方法で、臨床サンプル中で直接生物を検出することが可能であることが証明された。

*Pseudomonas aeruginosa*を研究するためのDNAプローブは、既に記載されており、主に疫学的分類に使用されている (Ogle et al., 1987; Samadpour et al., 1988; McIntosh et al., 1992)。しかし、これらのプローブのいずれも16S-23Sスペーサーから誘導されたものではない。

以下の種: - *Pseudomonas aeruginosa* 5669 - *Pseudomonas alcaligenes* LMG 1224T - *Pseudomonas fluorescens* LMG 5167 - *Pseudomonas putida* LMG 2232 - *Pseudomonas stutzeri* LMG 2333T - *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG 1225Tにいて、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域および23S rRNA遺伝子の一部を、保存プライマー (上流プライマー: TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA (SEQ ID NO 155); 下流プライマー: CCTTTCCTCACGGTACTGGT (SEQ ID NO 156)) で増幅した。

得られたアンプリコン (amplicons) のクローニングを促進するために、Not I 認識部位を下流プライマーに付加した。精製およびNot Iでのフラグメントの消化後、このアンプリコンをEcoRV/Not Iで消化したpBluescriptSK+プラスミドベクターにクローン化した。

プラスミドベクターに配置したプライマーの組み合わせの二本鎖プラスミドDNAを使用して、または内部PCRプライマーとの組み合わせの精製後のPCR産物について直接のいずれかで、ジデオキシ鎖停止化学法 (dideoxy-chain terminating chemistry) により、16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域の配列決定を行った。

図36~40は、上記の異なる*Pseudomonas*種由来の16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域のヌクレオチド配列を表す。*P. fluorescens*については、部分配列情報のみが得られた。

*P. aeruginosa* 5669株由来のスペーサーの核酸配列から、5つのオリゴヌクレオチドプローブを選択して化学合成した。それらのオリゴヌクレオチドの配列は、下記のとおりである: リバースハイブリダイゼーションアッセイを用いて、オリゴヌクレオチドプローブの特異性および感度の試験を行った。異なる試験細菌のゲノムDNAを、ビオチン化プライマー (クローニング用と同じプライマー、上記参照) を用いて増幅した。16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域にわたる、得られたアンプリコンを変性して、異なるオリゴヌクレオチドプローブを線状に固定化したメンブランストリップにハイブリダイズさせた (LIPA)。ハイブリダイゼーションは、3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0) および20%ホルムアミド (FA) の混合物中で50℃の温度で1時間行った。同じ混合物中で同じ温度で15分間洗浄を行った。

アルカリホスファターゼに結合したストレプトアビジン結合体を用いてハイブリッドを検出し、NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) およびBCIP (ブロモクロロインドリルリン酸) を用いる沈降反応によりプローブを可視化した。

プローブPA1、PA2およびPA3で得られたハイブリダイゼーション結果を表4に示すが、これは、プローブPA1およびPA3が、*Pseudomonas aeruginosa*に対して100%特異的であり、全ての試



験株にハイブリダイズしたことを示している。プローブPA3による50℃でのハイブリダイゼーションシグナルは最適ではなかったため、この特定のプローブに幾つかの追加のヌクレオチドを付加することにより、このオリゴヌクレオチドプローブを改良した。この新たに設計したプローブはPA5である。

プローブPA5によるハイブリダイゼーション実験により、このプローブも*P. aeruginosa*に対して100%の特異性および100%の感度を示すことが判った。

オリゴヌクレオチドプローブPA2は、試験した*P. aeruginosa* 17株の内5株のみにハイブリダイズした。これらのプローブにハイブリダイズしなかった株の16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域の直接配列決定により、異なる株間の幾つかの異質性が示された。最初に開発したPA2プローブとの比較により2つのミスマッチが見られた。PA2プローブの領域における異なる株間のこの異質性を克服するために、新規プローブPA4を設計した。このプローブは、ミスマッチの位置で縮重して、いるので、50℃でのハイブリダイゼーションシグナルを改善するために幾つかの追加のヌクレオチドを付加した。

ハイブリダイゼーション結果に示されるように、この縮重プローブにより100%の特異性および100%の感度が得られた。

実施例2: *Mycobacterium* 種々のマイコバクテリア種が、重篤なヒトの感染症に関与し得る。有名な例は、*Mycobacterium tuberculosis*および*Mycobacterium leprae*である。最近では、特に免疫不全の宿主において、ヒトの病原体として、*M. avium*、*M. intracellulare*および*M. kansasii*のような他の種にしばしば遭遇するようになった。

したがって、マイコバクテリア感染症の臨床検査診断は、*M. tuberculosis*複合体に限定するべきでなく、理想的には大部分の臨床的に関連するマイコバクテリア種を含むべきである。従来の検査技術による種のレベルでの病原性マイコバクテリアの同定および識別は、一般に、困難で時間のかかることである。

これらの問題を克服するためにDNA技術を手段とした。報告されている方法は、直接的なDNAプロービングから自動化配列解析にまで及ぶ。幾つかのアプローチが最近になって報告されている

(Jonas et al., 1993; Frothingham and Wilson, 1993; Tomioka et al., 1993; Saito et al., 1989; Vanechoutte et al., 1993; Telenti et al. しかし、これらの方法は全て独特の不利な面を有し、これらの大部分は未だに培養に依存している。さらに、そして最も重要なことに、これらの方法のいずれによっても、1回の試験操作で異なる臨床的に関連するマイコバクテリア種の同時検出が可能ではない。また、*Mycobacterium avium-intracellulare*複合体内の特定の群の識別は困難であり、しばしば不可能でさえある。

上述の不利な点を克服するために、多くの*Mycobacterium*の種および群を同時に高い信頼性で検出および識別を可能にするLiPA試験が開発された。これらの目的を達成するために使用されるプローブのセットは、全て16S-23S rRNAスペーサー領域から誘導した。使用される方法は、実施例1に記載された方法と同様である。

16S-23S rRNAスペーサー領域、並びに16Sおよび23S rRNA近接遺伝子の一部を、*Mycobacterium*属用に保存されているプライマーでPCRにより増幅した。上流プライマーとして16S遺伝子に位置する少なくとも1つの以下のプライマーを使用した：増幅のため下流プライマーとして23S遺伝子に位置する少なくとも1つの以下のプライマーを使用した：*M. chelonae*に対して作用しなかったプライマーMYC-P2を除いて、上述の全てのプライマーは、試験した全ての*Mycobacterium*株のスペーサー領域を増幅した。検出の感度を増強するために、P5およびP4を外部プライマーとして、P1およびP3を内部プライマーとして使用して、時にはネステッドPCR (nested PCR) を行った

本発明者らの目的に適合するプローブおよびプローブの組合せを設計して選択できるようにするため、多くのマイコバクテリア株の16S-23S rRNAスペーサー領域を配列決定した。得られた配列を相互に、および文献から公知のもの（例えば、Fronthingham et al., 1993, 1994; Kempell et al., 1992; Suzuki et al., 1988; EP-A-0395292; Van der Giessen et al., 1994）または公的に利用可能なデータバンクからのものと比較した。対応する配列は、図1～35に表される（SEQ ID NO 76～SEQ ID NO 110）。

これらのデータから誘導したプローブは全て、統一されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件（即ち、3×SSC、20%脱イオン化ホルムアミド、50℃）を用いて所望のハイブリダイゼーション特性が得られるように調整した。異なるマイコバクテリア株にハイブリダイゼーションさせるために使用される調整した1セットのプローブは、表1a、SEQ ID NO 1～33に表される。本実施例において使用されるプローブの命名法は、表1aで使用されるものを略したものであり、即ち、「ICG」の文字は常に割愛されていることに注意されたい。得られた特異的なハイブリダイゼーションパターンにより、試験株は、下記の種または種の群の1つに割り当てることができた：*M. tuberculosis*複合体、*M. avium*、*M. intracellulare*または*M. intracellulare*複合体、*M. kansasii*、*M. chelonae*および*M. gordonae*。各群に属する試験株を、表4にまとめる。全ての株は、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから入手した。各群について得られた異なるプローブパターンを表3に示し、更に詳細に後述する。

*M. tuberculosis*複合体 *M. tuberculosis* 複合体は、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. africanum*および*M. microti*に属する全ての株を含む。プローブMtb1、Mtb2およびMtb3は、全ての試験した*M. tuberculosis*複合体株に由来するDNAとハイブリダイズする。試験した他の株のいずれも、使用した条件ではこれらのプローブとはハイブリダイズしなかった。

更に、*M. tuberculosis*複合体株は、試験した他の全てのマイコバクテリア株の場合と同様に、myc1若しくはmyc22プローブのいずれかまたは両方とハイブリダイズする。これらの2つのプローブは、単独または相互の組合せで、一般的なMycobacteriumプローブとして設計されている。*M. avium*/*M. paratuberculosis* 検討した全ての*M. avium*および*M. paratuberculosis*は、1セットのプローブにより同一のハイブリダイゼーションパターンを示した。このタイプの生物では、プローブmyc1/myc22、mail、mil11、mav1、mah1およびmav22により陽性のハイブリダイゼーションシグナルが得られる。後の2つのプローブは、*M. avium*および*M. paratuberculosis*株と独占的にハイブリダイズし、このため、種特異的プローブとして使用することができる。*M. avium*単離体および*M. paratuberculosis*単離体の16S-23Sスペーサー配列は、同一であるか、またはほぼ同一であるため、これら2つの分類群は、相互に識別することができない。この知見は、*M. avium*および*M. paratuberculosis*が、実際1つの遺伝子種に属すると考えるべきである（Rogal et al., 1990）（*M. avium* spp. *avium*および*M. avium* spp. *paratuberculosis*）ことを示す16S rRNA配列データを支持する。

*M. intracellulare*および*M. intracellulare*複合体（MIC） MIC株は、16S-23S rRNAスペーサー領域の配列データによると、他のMycobacterium種から分離した別個のクラスターに属する、遺伝子型的に非常に近縁の生物である。*M. avium*および*M. scrofulaceum*は、これらに最も近い類縁体である。一般に*M. avium*複合体（MAC）株（以前のMAIS-複合体）と呼ばれる試験したほぼ全ての株は、MIC群に見い出すことができる。即ち、本発明で定義されるMIC群は、*M. scrofulaceum*であると考えられるMAC-Gを除いて、FronthinghamおよびWilson（1993

)により報告されたMACタイプ株を包含する。また、狭義のM intracellulare株

(M intracellulares. s.) もこのクラスターの一部である。  
このMIC群は、その中の亜群が、プローブのセットに対して異なるハイブリダイゼーション特性を示

すような、非常に大きな群の株を含有するため、MIC型に更に細分することが考えられた。

MIC 1型は、幾つかの他のMAC株と共にM intracellulare s. s.を含む。全てのMIC 1型単離

体は、例外なく、以下のプローブとハイブリダイズする：myc1/myc22、mai1およびmac1。以下のプロー

ブは、MIC 1群内で更に細分するために使用することができる：mil11、min1、min2～2222、mil22

およびmhcf1。

狭義のM intracellulare株 (MIC 1.1. a型) は、この群の株にのみ陽性であるプローブmin1により、

この群を他のサブタイプから識別することができる。MIC 1.1. a型株の全ての株は、MACに対する

Gen-Probe Rapid Diagnostic systemのM intracellulareプローブにより試験する時、陽性である。M

IC 1.1. bおよびMIC 1.2 型は、M intracellulareに非常に近縁の株を含む。これらは、mil11およ

びmi122プローブを用いることにより識別することができる (表3参照)。これらの群内の更なる細分

は、プローブ：min2、min22、min222およびmin2222を用いることにより達成できたであろうが、試みら

れなかった。更なる細分は、疫学的な動機に有用であろう。

本発明者らの試験した株のコレクションの内2つだけが、MIC 2株として分類される。これらの株

の1つは「Mycobacterium lufu」株 (ITG 4755) である。これらの株により生成する特異的な

プローブパターンは、以下のプローブによる陽性のハイブリダイゼーションシグナルを特徴とする：

myc1/myc22、mai1、mil22、mah1およびmai1。min2222、mac1およびmhcf1プローブにより可変のハイ

ブリダイゼーション結果が得られる。他のプローブは陰性である。この型の更に多くの株を同定する時、

MIC 2が異種の群であることが最終的に判るということはあるにない。これが適切なのであれば、

可変のプローブは、更なる区別に役立つであろう。

MIC 3型には、M intracellulare s. s. 株に関係の遠いかなり多くのMAC株および大部分の他のM

AC株が分類される。このクラスターは、遺伝子型に基づきM aviumおよびM intracellulareとは別個

のものと見なされる。全てのMIC 3サブタイプは、myc1/myc22、mai1、mil22およびmco1プローブに

ハイブリダイズする。最後のプローブ (mco1) による陽性のシグナルは、MIC 3株の特徴である。以

下のプローブにより可変のハイブリダイゼーション結果が得られる：mac1、mhcf1およびmah1。MIC

3は、3つのプローブ：mth11、mth2およびmef11を使用することにより4つのサブタイプに更に細分

することができる。mth2 プローブは、免疫不全のヒトから単離された非常に近縁のMAC株の群を含む

MIC 3.1型に特異的である。大部分のMIC 3株は、MIC 3.1サブタイプに分類される。最終

的に、種の階層では、この群の株に指定されるかもしれないし、また、未だ命名されていないMAC

株の他の群であることもある。サブタイプMIC 3.4、MIC 3.3およびMIC 3.2は、本発明

者らの試験した株のコレクションでは各々わずか2つ、1つおよび1つの株である。

MIC 4型は、M intracellulareとは関係の遠い「MAIS」株 (M malmoenseを含む) のコレクション

である。一般的なmyc1/myc22 プローブを別にして、MIC 4にハイブリダイズする上述のセットの唯

一のプローブは、mai1プローブである。このプローブは、M avium、M intracellulareおよび他のMI

C株並びにM scrofulaceumにもハイブリダイズする、広い特異性を示す。

M scrofulaceum 試験した全てのM scrofulaceum株は、プローブのセットとの同一のハイブリダイゼー

ションパターンを示す。msc1プローブによる陽性シグナルは、M scrofulaceum株に独特なものである。

この種に対して陽性シグナルを有する他のプローブは、明らかにmyc1/myc22およびmai1のみである。

M kansasii mka3およびmka4プローブは、M kansasiiに特異的である：即ち、M kansasii株からの増幅

したDNAをハイブリダイゼーションに使用する時、L i P Aストリップ上で明確な陽性シグナルが得られるが、試験した他の全ての生物ではシグナルはない。mka1およびmka2プローブの配列は、標的配列と完全に相補的ではない（各々、3つおよび1つのミスマッチ）が、使用した条件（50℃、3×SSC、20%ホルムアミド）下で、これらは*M. kansasii* DNAに独占的にハイブリダイズし、試験した他のどのマイコバクテリアDNAにもハイブリダイズしないため、これらのプローブも有用であることが判った。このことは、プローブが有用であるために必ずしも標的に完全に一致する必要はなく、配列および長さの調節がある程度まで可能であることを示している。

*M. chelonae* *M. chelonae*種は、*M. chelonae* ssp. *chelonae*および*M. chelonae* ssp. *abscessus*株を包含する。各亜種の1つの株についてスペーサー領域を配列決定すると、小さな違いが観察された（SEQ ID NO 103およびSEQ ID NO 102）。mch1およびmch2プローブは、両方の株にハイブリダイズする。

myc1/myc22を除いて、他の全てのプローブは、これら2つの株に対して陰性である。

表4に記載されていない更に2つの*M. chelonae*株（即ち、両者ともInstitute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから入手した*M. chelonae* 94-379および*M. chelonae* 94-330）とのmch1およびmch2プローブの試験の結果、これらはmch1プローブとハイブリダイズしなかったようであった。これは、これら2つの株のスペーサー領域の配列決定により確認した（SEQ ID NO 184）。他のマイコバクテリアによるスペーサー領域のクラスター解析により、*M. chelonae*株は2つの群に細分することができることが判った。この第2群の株（94-379および94-330が属する）を特異的に検出するための、第3のmch3プローブを設計した。

このことは、16S-23S rRNAスペーサー領域から誘導されたDNAプローブの使用が、古典的な同定法によっては同じ種に属する、異なる群の株を識別するのに役立つこと、そして恐らくマイコバクテリアの新規な種を検出して記載するために使用することができることを示している。この場合、

mch2は、全ての*M. chelonae*株を検出するが、mch1およびmch3は、異なる亜群を識別する。

*M. gordonae* 試験した5つの*M. gordonae*株は、全てmgo5プローブにハイブリダイズする。myc1/myc22プローブでも陽性のハイブリダイゼーションシグナルが得られ、そして幾つかの*M. gordonae*株は、mgo1およびmgo2にもハイブリダイズする。

他のマイコバクテリア種 上述以外のマイコバクテリア種に属する株は、一般的なプローブである

myc1/myc22にのみハイブリダイズする。これは、これらの株が、恐らくMycobacterium属には属するが、記載された他のプローブの1つまたはそれ以上を使用することにより特異的に同定することができる1つの種または群に属さないことを示している。

結論として、本発明者らは、使用する本発明のプローブの特定の組合せにより、異なるレベルでのDNAプローブ試験を提供できると述べることができる。

全てのプローブを1回に同じL i P A試験に使用すると、種のレベルの識別およびマイコバクテリアの特定の群のサブタイプ分けを行うことができる。しかし、ストリップ上のプローブの組み立ては、種特異的なプローブに限定することができる：この場合種のレベルで同定が行われる。ストリップ上のプローブの数を更に減らすと、唯一のまたは少数の種の特異的な検出ができる。明らかに、サブタイプ株、例えば*M. intracellulare*複合株（M I C）に属する株に対して単独に試みるL i P Aストリップを設計することができる。マイコバクテリアの診断および/またはタイプ分けを行う検査室の特定のニーズに依存して、これら全ての異なる適用が有用であろう。しかし、L i P A形式でのプローブの組合せを使用することにより、臨床サンプル中に存在する生物の同定に関して得られる情報量は、単一のプローブのみを使用するDNAプローブ試験に比較してかなり上昇する。幾つかの群、または少なくとも幾つかの群の更なる細分については、この（亜）群と唯一ハイブリダイズする単一のプローブは設計すること

ができなかった。この場合、プローブパターンのみが、必要な情報を提供することができる。これらの

適用のために、L i P Aは、有利な形式である。

実施例3 : *Listeria* *Listeria*種は、天然に広く存在するグラム陽性桿菌の1群である。この群内で、*L. monocytogenes*のみがヒトおよび動物に対して病原性であると考えられる。*L. monocytogenes*は、髄膜炎 (meningitis)、流産 (abortion)、脳炎 (encephalitis) および敗血症 (septicemia) を起こすリステリア症の原因である。免疫不全の個体、新生児および妊婦は、この食品が原因の疾患に対する高リスク群である。多くの場合動物由来の食物、特にソフトチーズの消費により引き起こされる。したがって、*L. monocytogenes*の存在は食物から排除されるべきである。安全性の測定として、幾つかの国では、食品中に全ての*Listeria*種が存在しないことを要求している。

日常食品中の*L. monocytogenes*の古典的な同定方法は、48時間の富化培養およびこれに続く選択的寒天培地で48時間のコロニー形成、次いで生物化学および形態学的アッセイの全部を含む (Farber and Peterkin, 1991)。この方法は、遺伝子プローブの使用により非常に単純化することができた。*L. monocytogenes*の同定について、幾つかのDNAプローブが既に報告されている。この生物の病原性を担う遺伝子 (例えば、リステリオリシン (listeriolysin) O遺伝子 (Datta et al., 1993) または侵襲関連タンパク質 (invasion-associated-protein: i a p) (Bubert et al., 1992)) から幾つかのプローブが誘導されている。

特異的16S rRNAプローブに基づく市販の同定システムが、GenProbe (Herman and De Ridder, 1993; Ninet et al., 1992) により紹介された。これらの特異的なプローブは、富化および選択的寒天培地への塗布後得られたコロニーに、確認アッセイとして使用される。

最近幾つかの刊行物が、DNAプローブの標的領域を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応の使用を報告しているが、これらにより、アッセイの特異性および感度を妨害することなく、アッセイ時間を短縮することができる。*L. monocytogenes* DNAを特異的に増幅することができる、異なるプライマーセットが報告されている。これらのプライマーセットは、リステリオリシンO遺伝子 (Golstein Thomas et al., 1991)、およびi a p遺伝子 (Jaton et al., 1992) から誘導された。

本発明者らは、*Listeria*の属特異的プローブおよび*Listeria monocytogenes*に特異的なプローブの開発の標的として16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域を使用した。

16S rRNAの3'末端および23S rRNAの5'末端から誘導された保存プライマー (配列は実施例1で作成した) を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応を使用してスペーサー領域を増幅し、次に実施例3と同じ方法により適切なプラスミドベクターにクローン化した。

長さの異なる2つのアンプリコン (800bpおよび1100bp) を得た。両方のPCRフラグメントを以下の*Listeria*種についてクローン化した: -*Listeria monocytogenes* (serovar) 4b, IHE

(Instituut voor -*Listeria ivanovii* C I P 78.42 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, France)  
-*Listeria seeligeri* 血清型 4a, nr. 42.68 (Bacteriologisches Milchwirtschaft Weihestephan, Germany)。

16Sおよび23S rRNA遺伝子の間のスペーサー領域の配列は、800bpのPCRフラグメントに由来するクローン化された材料を使用して決定され、これは、3つの記載された*Listeria*種に関して行われた。図41~43は、得られた異なる短いスペーサー領域の配列を示す。*L. monocytogenes*のこの短いスペーサー領域の配列はまた、EMBLデータバンクからも検索された (LMRGSPCR)。この配列情報に基づき、種特異的検出のための以下のオリゴヌクレオチドを選択して化学合成した: また、*Listeria*に対する属特異的プローブを設計した: このオリゴヌクレオチドプローブをメンブランストリップに固定化して、ビオチン化PCRフラグメントによるリバーサハイブリダイゼーション後、沈降反応を用いてハイブリッドを可視化した。異なる*Listeria*種のハイブリダイゼーション結果を表5に

要約する。  
 これらのハイブリダイゼーション結果は、L I S 1プローブが全ての記載されたListeria種を検出することができるが、また種特異的なプローブは、相互に交差ハイブリダイズすることをも示している。このため、この短いスペーサー領域からは十分な特異性を有するプローブは見い出しえなかった。Listeria monocytogenesに関して、1100 bpフラグメントに由来する16S-23S rRNA遺伝子スペーサーも配列決定した。図45は、この種で得られた配列を示している。この配列情報はまた、L. seeligeri (図46参照) についても得られ、大きなスペーサー領域の部分配列情報は、L. ivanovii (図44参照) についても得られた。  
 L. seeligeriでの配列の整合性に基づき、L. monocytogenesを特異的に検出するため以下のオリゴヌクレオチドプローブを選択した。  
 最初のハイブリダイゼーション結果 (示していない) は、他のListeria種との交差ハイブリダイゼーションがこのL. monocytogenesプローブLMO3では見られなかったこと、および使用した全てのListeria株が、一般的なプローブL I S 1にハイブリダイズしたことを示した。  
 オリゴヌクレオチドプローブ (全てのListeria種の検出のためのL I S 1、およびL. monocytogenesの特異的な検出のためのLMO3) はメンブランストリップに固定化して、16S-23S rRNAスペーサー領域を含有する、異なる生物から誘導された標識アンプリコンにハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ結果は、下記の表に示される。  
 各々種および属レベルでLMO3およびL I S 1プローブについて、優れた特異性および感度が得られた。  
 これら2つのプローブは、食品試料で直接、または液体ブロス中で試料の富化後、Listeria種およびL. monocytogenesの検出に使用することができる。どちらの場合も、これらの試料中の非常に高いバックグラウンドの微生物叢により保存プライマーセットについての増幅の問題が発生しうる。この問題を回避するために、本発明者らはListeria種の16S-23S rRNAスペーサー領域から誘導される数セットのプライマーを設計した。  
 プライマーL I S-P1およびL I S-P2は、上流プライマーであり、一方L I S-P3およびL I S-P4は、下流プライマーである。これらのプライマーセットは、小さい16S-23S rRNAスペーサー領域、およびListeria種 (L. grayiおよびL. murrayiを除く) の大きなスペーサーを増幅する。必要であれば、これらのプライマーは、L I S-P1/L I S-P4が外部プライマーであり、そしてL I S-P2/L I S-P3が内部プライマーである、ネステッドPCRアッセイに使用することができる。  
 Listeria monocytogenesの特異的な検出のために、LMO-ICG-3プローブを設計して、16S-23S rRNAの大きなスペーサー領域から誘導した。  
 試料中でのこの病原体の改良された直接検出用にこの大きいスペーサー領域のみを特異的に増幅するため、小さいrRNAスペーサーには存在しない16S-23S rRNAの大きなスペーサー領域からの配列情報の一部から、1セットのプライマーを誘導した。この目的のため、プライマーL I S-P5およびL I S-P6を上流プライマーとして使用し、L I S-P7を下流プライマーとして使用する。  
 Listeria spp. に対するプローブの評価において、古典的な測定方法ではListeriaに類似しているある生物をチーズから単離した。この単離体 (MB405) は、以下の特徴を示した (Listeria spp. に類似) : グラム陽性、オックスフォードおよびトリブチックスイ寒天 (Tryptic Soy Agar) 上で増殖、カタラーゼ陽性。Listeria spp. との唯一の違いは、運動性が陰性であることであった。  
 この単離体MB405の16S-23S rRNAスペーサー領域を増幅するために、実施例1に記載した保存プライマーを使用して、この株でListeria spp. と同じアンプリコンパターンが得られた。このアンプリコンのハイブリダイゼーションでは、Listeria spp. に対するどのプローブでもシグナルは

得られないことを示した。

単離体MB405の16S rRNAの配列決定およびその後のListeria spp. および類似体との比較により、この生物は、現在までに文献に記載された他のどの種よりもListeria spp. により近縁であることが示された。分類学的検討を行えば、この単離体がListeria属に属するが否かが判るであろう。この単離体、および同じタイプから続いて単離された生物は、本出願においてはListeria様生物と呼ばれる。

単離体MB405は、クローン化され配列決定された少なくとも3つの異なる16S-23S rRNAスペーサー領域を含有するようであった。

Listeria spp. との整合により、Listeria様株を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを選択した：このプローブとListeria spp. の16S-23S rRNAスペーサー領域とのリバースハイブリダイゼーション反応では、交差ハイブリダイゼーションは見られないことを示した。

実施例4：Chlamydia trachomatis Chlamydia trachomatisは、小さな偏性細胞内グラム陰性細菌であり、主要外膜タンパク質（major outer membrane protein）（MOMP）により識別される15の血清型（A～K、Ba、L1、L2およびL3）を有し、細胞内増殖に必要な潜在プラスミドを含有する。

A～KおよびBa血清型は、トラコーマの生理学的性状型（biovar）を構成し、一方L1、L2、およびL3血清型は、LGVの生理学的性状型を構成する。

A、B、Ba、およびC血清型は、通常トラコーマに関連しており、予防可能な盲目を世界中に引き起こす。D～Kの血清型は、主に性行為感染症で見い出され、女性の子宮頸管炎および骨盤内炎症性疾患、並びに男性の尿道炎および精巣上体炎の主要な原因である。L1、L2およびL3血清型は、稀な性行為感染症である性病性リンパ肉芽腫に関係している。

細胞培養は、臨床検査診断のための基準法と見做されるが、輸送中検体の生存力を維持することは難しく、検査法には時間がかかり技術が要求される。したがって、固相酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay）および直接蛍光抗体染色のような、多くのより迅速な試験キットが開発された。しかし、これらの免疫測定法のいずれもが、高レベルの感度または特異性を有することが証明されていない。

クラミジアのrRNAを検出する非アイソトープ性DNAプローブアッセイ（Gen-Probe PACE；Woods et al., 1990）が市販されている。最近、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法がChlamydia感染の検出に使用されるようになった。検出は、潜在プラスミド（Loeffelholz et al., 1992）、または主要外膜タンパク質をコードするomp1 遺伝子（Taylor-Robinson et al., 1992）のいずれかを標的とした。他の方法に比較して、PCRは感度および特異性が高い（Ossewaarde et al., 1992）。これらのアッセイのいずれもが、16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域から誘導されるDNAプローブを利用していない。

Chlamydia trachomatis L2 およびChlamydia psittaci 6BC株について、保存プライマー（実施例1参照）を使用して16S-23S rRNAスペーサー領域を含有するリボソームRNAシストロンの一部を増幅して、次にプラスミドベクターにクローン化した。ジデオキシ鎖停止化学法を用いて、この16S-23S rRNAスペーサー領域を配列決定した。

両方のChlamydia種のスペーサー領域の配列を図47～48に示す。

この配列情報に基づき、以下のオリゴヌクレオチドプローブを化学合成した：オリゴヌクレオチドプローブをメンブランストリップ上に線状に固定化して、次に標的として、16S-23S rRNAスペーサー領域を含有する、ビオチン化PCR産物による、リバースハイブリダイゼーションアッセイに使用した。

ハイブリダイゼーションは、50℃の温度で3×SSCおよび20%ホルムアミド（FA）の溶液で行った。

異なるプローブによるハイブリダイゼーション結果を以下の表に示す。

表に示すように、50℃のハイブリダイゼーション温度ではCHTR1、CHTR2およびCHTR3プローブは、*Chlamydia trachomatis*に特異的であり、CHPS1プローブは、*Chlamydia psittaci*に特異的である。

従来法を使用して*Chlamydia trachomatis*として同定した、SSDZ, Delft, Netherlandsから入手した幾つかの臨床単離体を、異なるオリゴヌクレオチドプローブによりリバーサハイブリダイゼーションアッセイで試験した。全ての*Chlamydia trachomatis*特異的プローブは、陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与え、単離体のいずれもが、*Chlamydia psittaci*プローブとは反応しなかった。幾つかの臨床単離体については、CHTR2プローブは、CHTR1またはCHTR3に比べて著しく弱く反応した。これらの単離体の1つ(94 M 1961)のスペーサー領域を配列決定して(SEQ ID NO 197)、配列にはL2株のスペーサー配列とは1つのミスマッチがあることが判った。追加のプローブ(CHTR4)は、この新規なスペーサー配列から誘導した：このプローブは、*Chlamydia trachomatis*からの幾つかの臨床単離体と、CHTR2よりも強いハイブリダイゼーションシグナルを与える。これは、単独が、またはCHTR2プローブとの組合せで使用することができる(例えば、両方のプローブを1つのLIP Aラインに適用する)。

臨床検体中の*Chlamydia trachomatis*の直接検出用の非常に高感度のアッセイを開発するために、*Chlamydia*種のスペーサー領域を特異的に増幅する、特異的なプライマーセット、CHTR-P1(上流プライマー)およびCHTR-P2(下流プライマー)、を16S-23S rRNAスペーサー領域から誘導した。

実施例6：*Mycoplasma pneumoniae*および*Mycoplasma genitalium* マイコプラズマは、無細胞培地で増殖し、細胞壁を欠いており、そしてG+C含量の低い非常に小さいゲノムを有する、最も小さな原核生物の群である。100以上の異なる種が、ヒト、動物、植物、および昆虫から単離されている。ヒトでは、マイコプラズマは、病原性生物または共生生物のいずれかとして認識されている。最もよく知られた病原体は、特に小児および青少年の、原発性非定型肺炎の原因である、*Mycoplasma*

*pneumoniae*である。*M. pneumoniae*の診断は、培養法による直接単離または患者血清中の*M. pneumoniae*に対する特異的抗体の検出に基づいていた。最初に非淋菌性尿道炎の患者からの尿道検体から単離された別の病原体は、*M. genitalium*として報告された。このマイコプラズマは、*M. pneumoniae*と共通の幾つかの性質を有する。両種とも病原性であり、両者とも赤血球、種々の組織細胞、ガラス、およびプラスチック表面に付着する能力を有する。更には、*M. genitalium*および*M. pneumoniae*は、抗原を共有するため、血清試験において広範囲の交差反応を起こす。*M. genitalium*は肺炎の患者からの気道試料にも見い出され、*M. pneumoniae*との混合物から単離されたという観察は、*M. genitalium*の病原性の可能性に疑問を投げかけている。両方の種の培養は時間がかかり、血清検査は特異性が低いため、これらマイコプラズマを同定するため、より迅速で特異的なアッセイが開発された。DNAプローブによるハイブリダイゼーションアッセイの使用は、これらの種について報告されたが、良好な特異性にもかかわらず、これらの試験では、低レベルの*M. pneumoniae*または*M. genitalium*を検出できない。このため更に最近になって、ポリメラーゼ連鎖反応を使用するDNAハイブリダイゼーション法が開発された。P1アドヘシン(adhesin)遺伝子(Buck et al., 1992)および16S rRNA遺伝子(Kuppeveld et al., 1992)を用いる*M. pneumoniae*特異的PCRアッセイが報告された。アドヘシン遺伝子および16S rRNA遺伝子からの配列を用いる、*M. genitalium*用の特異的PCRアッセイが報告された。

*M. pneumoniae* および *M. genitalium* の臨床単離体 (U. 列を決定した。これらを図49～50に示す。この配列は、EMBLデータバンクに寄託された同じ種の他の株(各々MPMACおよびMGG37)由



来の配列とは多少異なっている。この情報に基づき、4つのプローブを誘導した：1つの一般的なマイコプラズマプローブ、2つの*M. pneumoniae*特異的プローブ、および1つの*M. genitalium*特異的プローブ：プローブをLiPAストリップに適用して、4つの*M. pneumoniae*株、1つの*M. genitalium*株および22の非*Mycoplasma*種の株からの増幅したスペーサー材料に標準的条件（3×SSC、20%ホルムアミド、50℃）下でハイブリダイズさせた。一般的なプローブは、試験した5つの*Mycoplasma*株にのみハイブリダイズし、一方特異的プローブは、そのためにそれが設計された種の株にのみハイブリダイズした。

実施例7：他のマイコバクテリア種 検査技術の着実な進歩により、いわゆる「潜在的に病原性の環境的マイコバクテリア」の分類学および臨床的な意味に関する情報が急速に増加した。新たに認識された疾患の出現により、異なるマイコバクテリア種に関連したさらなる症状が現われ、重要性を帯びてきた。

実施例2に記載されるような、異なるマイコバクテリア種の同時検出用にLiPA試験を拡大するため、以下の種を特異的に同定するよう新規なセットのDNAプローブを設計した：*Mycobacterium*

*ulcerans*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium celatum*および*Mycobacterium haemophilum*。これらのプローブは、16S-23S rRNAスペーサー領域配列から誘導した。上述の種について

、PCR産物の直接配列決定により、またはPCR増幅スペーサー領域のクローニング後、この情報を得た。得られた配列を図80～97に、および*M. malmoense*については図38に示す。

上述のマイコバクテリア種のスペーサー領域の配列を、実施例2または公衆に利用可能な供給源に既に記載された配列と比較して整合をとった。多様な領域から、種特異的なDNAプローブを設計した。実施例2で言及した他のマイコバクテリアプローブについて明記したのと同じ条件（即ち、3×SSC、20%脱イオン化ホルムアミド、50℃）下で所望のハイブリダイゼーション特性（即ち、種特異的なハイブリダイゼーション）が得られるように、プローブを選択して設計した。これは、少なくとも2つの（可能であれば全ての）本発明に記載されたマイコバクテリア種の同時検出を可能にする。

以下のオリゴヌクレオチドプローブは、各々*M. ulcerans*, *M. genavense*, *M. xenopi*, *M. simiae*,

*M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. celatum*および*M. haemophilum*のスペーサー領域配列から設計した：プローブをLiPAストリップに固定化して、実施例2に記載された1セットの代表的なマイコバクテリア種から誘導した増幅したビオチン化物質とハイブリダイズさせた。スペーサー領域の増幅は、実施例2に記載されたプライマーセットを使用してPCRにより行った。特異性試験に使用した異なる株を、得られたハイブリダイゼーション結果と共に表8に示す。この菌株は、Institute for Tropical

Medecine, Antwerp, Belgiumのコレクションから入手した。

試験したプローブ（MS1-ICG1、MXE-ICG-1、MFO-ICG-1、MFO-ICG-2、MML-ICG-1、MML-ICG-2、MCE-ICG-1およびMHP-ICG-1）は、各々*M. simiae*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. celatum*および*M. haemophilum*を特異的に検出し、試験した他のマイコバクテリア種とは交差ハイブリダイゼーションを示さなかった。したがって、これらのプローブは、実施例2に記載されたDNAプローブのセットを使用して更に同定できなかった、マイコバクテリア種の特異的な検出を可能にする。*M. malmoense*は、実施例2では「MIC4」型として分類されたが、上述の他の種は、*Mycobacterium*属に対する一般的なプローブMYC1/MYC2

2にのみハイブリダイズしたため、実施例2では「他のマイコバクテリア種」として分類された。全ての試験した*M. genavense*単離体は、MGV-ICG1およびMGV-ICG2と反応したが、

*M. genavense*に非常に近縁の*M. simiae*用に設計されたMS1-ICG1とは反応しなかった。*M. simiae*

とM. genavenseの間に位置する1群の「中間体」生物を、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから受け取ったが、これらは「M. simiae様」として分類されていた(4358、4824、4833、4844、4849、4857、4859、7375、7379、7730、9745、94-1228株)。これらの株は、MGV-1CG2プローブとのみ反応し、狭義のMycobacterium simiae株を特異的に検出するMS1-1CG1プローブとは反応しなかった。これら2つの「M. simiae様」単離体(7379および9745株)の16S-23S rRNAスペーサー領域の配列決定(SEQ ID NO 161および162参照)により、これらがM. simiaeよりもM. genavenseと近縁であることを確認した。おそらく新種に属する、この群の生物を特異的に検出するように、新規プローブMGV-1CG3を設計した。

このことは、16S-23Sスペーサー領域から誘導したDNAプローブの使用が、古典的な分類学上の基準により決定できない異なる群の株を識別するのに役立つことを再度示している。これらのDNAプローブの使用は、恐らくマイコバクテリアの新規な(亜)種の記載にいたるであろう。この場合、MGV-1プローブは、狭義のM. genavense株にのみ反応し、MGV-3プローブは、中間体の「M. simiae様」株にのみ反応し、そしてMGV-2プローブは、両方の型の株を検出するであろう。MUL-1CG-1プローブは、試験した全てのM. ulcerans株と反応したが、M. marinum株ITG7732とも交差ハイブリダイゼーションを示した。このM. marinum株のスペーサー領域の配列決定により、実際M. ulcerans株1837の配列と同一配列であることを明らかにした(図80参照)。M. marinumおよびM. ulcerans間のさらなる識別は、M. ulceransの16S-rRNA遺伝子(この一部は増幅のためにMYC P1~P5プライマーを使用する時スペーサー領域と共に同時増幅される)からのプローブを使用して行うことができる。マイコバクテリア種の識別のためのスペーサープローブと同じハイブリダイゼーション条件下で作用可能な、M. ulceransの種特異的な16S rRNAプローブは、例えば以下のものである。上記段落は、スペーサー領域から誘導したプローブを使用することが好適であるが、このスペーサープローブを他の遺伝子配列(例えば16S rRNA遺伝子)から誘導したプローブと合わせることも可能であり、そして時には必要であることを示している。ここで再度、これらの追加のプローブは、スペーサープローブと同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で所望のハイブリダイゼーション特性を示すように選択される。

M. kansasiiについて、実施例2で述べたものに追加の株を、実施例2で記載されるMKA-1CG-1、2、3および4プローブで試験した。これらのプローブのいずれも完全に満足のいくものではなかったため、M. kansasiiの検出のために追加のプローブを設計した。このために、追加のM. kansasii株ITG6328、8698および8973の幾つかのスペーサー領域を配列決定した(図90~92参照)。これらの株も、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから入手した。明らかに、M. kansasii株は、異なる株とはスペーサー配列に著しい違いを有する、全くの異種の群を構成する。前述のものと同じ条件(即ち、3×SSC、20%脱イオン化ホルムアミド、50℃)下で全て再度ハイブリダイズする、追加のプローブMKA-1CG-5、6、7、8、9および10を設計した。

Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgiumから入手した試験株のコレクションによりプローブを試験して、結果は表8に示す。

試験した限りではM. kansasiiプローブのいずれもが、M. kansasii以外の種とはハイブリダイズしない。しかし、この種の異種性により、M. kansasiiプローブのいずれもが、全てのM. kansasii株とはハイブリダイズしない。異なるM. kansasiiプローブは、M. kansasiiの異なる株を認識する。この識別ハイブリダイゼーションは、臨床的重要性を有する。他方では、全てのM. kansasii株の検出が必要であるならば、

異なる*M. kansasii*プローブの組合せを考えることができる。

実施例8：*Brucella* ブルセラ症は、非常に広範囲で経済的に重要な、ヒトにも感染する動物原性感染症である。

*Brucella* spp. の同定のためには、主に細菌学および免疫学的検出法が使用されている。これらの試験は、時間がかかり、しばしば偽陽性の結果を与える。

主にDNA増幅およびハイブリダイゼーションに基づく、迅速で信頼性の高い同定法が開発されている。

4 3 kDaの外膜タンパク質 (Fekete A. et al., 1990) または16S rRNA遺伝子の一部 (Herman and De Ridder, 1992) の増幅に基づく*Brucella* spp. の特異的な検出法が既に報告されている。

*Brucella* spp. の検出のための特異的DNAプローブおよびプライマーを開発するために、本発明者ら

は、16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域を解析した。保存プライマー（配列は実施例1に与えられる）を使用して、スペーサー領域を増幅し、次に実施例1と同じ方法によりBluescriptSK+ベクター中にクローン化した。

長さ約1400 bpの得られたアンプリコンを以下の*Brucella*種についてクローン化した：構築物をHindIII消化し、次に得られたフラグメント（n=3）をサブクローニングして、3つの記載された

*Brucella* spp. についてのスペーサー領域の配列決定を行った。図56、57および79は、各々

*Brucella melitensis*、*Brucella suis*および*Brucella abortus*の上述の株について得られたスペーサー

領域の配列を表す。異なる*Brucella*種間のこれらのスペーサー領域配列の高い相同性により、この配列

情報から種特異的なDNAプローブを導き出すことはできず、属特異的なプローブのみを設計した。

この目的で、以下のプローブを化学合成した：このオリゴヌクレオチドをメンブランストリップに固定

化して、ビオチン化PCRフラグメントによるリバースハイブリダイゼーション後、沈降反応を用いてハイブリッドを可視化した。異なる*Brucella* spp. および近縁の生物による固定化プローブのハイブリ

ダイゼーション結果を表9に表す。

これらのハイブリダイゼーション結果は、プローブBRU-1CG2、BRU-1CG3およびBRU-

1CG4が*Brucella* spp. に特異的であり、これらの病原体の検出のためのリバースハイブリダイゼ-

ーションアッセイに使用することができることを示している。プローブBRU-1CG1は、2つの分

類学的に非常に近縁の生物であるが、*Brucella*検出のために使用される同じ試料物質中に存在するとは

予想されていない、*Ochrobactrum anthropi*および*Rhizobium loti*株と交差ハイブリダイズする。

前記実施例（例えば3および4）に記載されたように、*Brucella*株からのスペーサー領域を特異的に増

幅するために16S-23S rRNAスペーサー領域から*Brucella*特異的プライマーをも選択した。

上流プライマーとしてBRU-P1およびBRU-P2を使用し、下流プライマーとしてBRU-P3

およびBRU-P4を使用する。ネステッドPCRアッセイに使用する時には、BRU-P1/BRU-

4の組合せが外部プライマーセットであり、一方BRU-P2/BRU-P3の組合せが内部プライ

マーセットである。

実施例9：*Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus*は、ヒトおよび動物の感染に最も普通に関

連しているスタフィロコッカス種である。*Staphylococcus aureus*株は、市中感染および院内感染の両

方での重要な病因として同定されている。最近メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-

resistant *S. aureus* : MRSA）による院内感染は、多くの国において益々流行してきたようである。

この種に属する株はまた、食品損傷および中毒の原因である。

他のスタフィロコッカスから*S. aureus*株を迅速で特異的な方法で識別するために、DNAプローブおよ

び/またはPCRに基づく分子的手法の使用が既に文献に記載されている。これらのDNAに基づくア

ッセイの開発に使用される標的遺伝子の例には、16S rRNA遺伝子 (De Buyser et al., 1992;

Geha et al., 1994)、*mecA*遺伝子 (Ubukata et al., 1992; Shimaoka et al., 1994) および*nuc*遺伝子 (

Brakstad et al., 1992; Chesneau et al., 1993) がある。  
 特異的DNAプローブの開発の標的として、本発明者らは16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域を選択した。16Sおよび23S rRNA遺伝子から誘導した保存プライマー（配列は実施例1参照）を使用して増幅すると、得られるパターンは、試験した全ての*S. aureus*株で類似ではなかった。得られたフラグメントの数およびこれらの異なるフラグメントのサイズに、多くの変動が見られた。UZG5728株からの1つのスペーサー領域およびUZG6289株からの4つのスペーサー領域（長さが異なる）を、BluescriptSK+ベクター中にクローン化して、次に配列決定した。配列を図64～図68に表す（SEQ ID NO 139～SEQ ID NO 143）。特異的なDNAプローブの開発のために、これらの異なるスペーサー領域を相互に、および*Staphylococcus epidermidis* UZG CNS41株から誘導したスペーサー領域（SEQ ID NO 144）と比較した。以下のプローブを化学合成した：このオリゴヌクレオチドをメンブランストリップに固定化して、ピオチン化PCRフラグメントによるリバースハイブリダイゼーション後、比色沈降反応を用いてハイブリッドを可視化した。異なる*Staphylococcus* spp. および非スタフィロкокカス生物との固定化プローブのハイブリダイゼーション結果を表10に表す。これらのハイブリダイゼーション結果は、STAU-ICG3およびSTAU-ICG4プローブのみが、*Staphylococcus aureus*株に特異的であることを示している。STAU-ICG1プローブは、試験した全ての*Staphylococcus* spp. と反応し、STAU-ICG2プローブは、*S. lugdinensis*株と交差ハイブリダイズする。STAU-ICG3プローブもSTAU-ICG4プローブも、試験した全ての*S. aureus*は検出しないが、両方のプローブをLIPAアッセイで同時に使用すると、試験した全ての*S. aureus*株がこれらのプローブの1つまたは両方とハイブリダイズする。